

B3

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **2002300896 A**

(43) Date of publication of application: **15.10.02**

(51) Int. Cl

C12P 7/04
///(C12P 7/04 , C12R 1:85), (C12P
7/04 , C12R 1:78), (C12P 7/04 ,
C12R 1:84), (C12P 7/04 , C12R 1:72
), (C12P 7/04 , C12R 1:44), (C12P
7/04 , C12R 1:265), (C12P 7/04 ,
C12R 1:05), (C12P 7/04 , C12R 1:01
), (C12P 7/04 , C12R 1:645)

(21) Application number: **2002010528**

(22) Date of filing: **18.01.02**

(30) Priority: **30.01.01 JP 2001021547**

(71) Applicant: **TOYOTA MOTOR CORP**

(72) Inventor: **MURAMATSU MASAYOSHI**
OBATA ATSUO
SHIMIZU AKIRA

(54) **METHOD FOR PRODUCING PRENYL ACLOHOL**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for producing prenyl alcohol with a microorganism which inhibits a squalene synthesis enzyme catalyzing a biosynthesis from farnesyl diphosphate to squalene.

SOLUTION: This method for producing the prenyl alcohol

is characterized by culturing a microorganism having a prenyl alcohol-producing ability in a culture medium containing a squalene synthesis enzyme inhibitor to produce and accumulate the prenyl alcohol on the inside and outside of the microbial cell and then collecting the prenyl alcohol.

COPYRIGHT: (C)2002,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-300896

(P2002-300896A)

(43) 公開日 平成14年10月15日 (2002. 10. 15)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード* (参考)
C 1 2 P 7/04	Z N A	C 1 2 P 7/04	Z N A 4 B 0 6 4
// (C 1 2 P 7/04			
C 1 2 R 1:85)		C 1 2 R 1:85	
(C 1 2 P 7/04		1:78	
C 1 2 R 1:78)		C 1 2 R 1:84	

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-10528 (P2002-10528)

(22) 出願日 平成14年 1 月18日 (2002. 1. 18)

(31) 優先権主張番号 特願2001-21547 (P2001-21547)

(32) 優先日 平成13年 1 月30日 (2001. 1. 30)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000003207

トヨタ自動車株式会社

愛知県豊田市トヨタ町 1 番地

(72) 発明者 村松 正善

愛知県豊田市トヨタ町 1 番地 トヨタ自動車株式会社内

(72) 発明者 小畑 充生

愛知県豊田市トヨタ町 1 番地 トヨタ自動車株式会社内

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外 1 名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プレニルアルコールの製造方法

(57) 【要約】

【解決手段】 プレニルアルコール生産能を有する微生物菌をスクアレン合成酵素阻害剤を添加した培地にて培養し、プレニルアルコールを菌体内外へ生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする、プレニルアルコールの製造方法。

【効果】 本発明によれば、医薬品・香料・化粧品・食品に利用可能なテルペン類、カロチノイド類、ステロイド類の生合成中間体として有用な、ゲラニルゲラニオール、ファルネソールなどのプレニルアルコールの生産効率を向上させることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下のいずれかの属に属するブレニルアルコール生産能を有する微生物菌をスクアレン合成酵素阻害剤を添加した培地にて培養し、ブレニルアルコールを菌体内外へ生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする、ブレニルアルコールの製造方法。

サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属
 サッカロミコシス (*Saccharomycopsis*) 属
 サッカロミコデス (*Saccharomycodes*) 属
 シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*) 属
 ヴィッカーハミア (*Wickerhamia*) 属
 デバリオミセス (*Debaryomyces*) 属
 ハンゼニアスポーラ (*Hanseniaspora*) 属
 ピキア (*Pichia*) 属
 キャンジダ (*Candida*) 属
 ザイゴサッカロミセス (*Zygosaccharomyces*) 属
 オガタエア (*Ogataea*) 属
 クライシア (*Kuraishia*) 属
 コマガタエラ (*Komagataella*) 属
 ヤロウヴィア (*Yarrowia*) 属
 クリベロマイセス (*Kluyveromyces*) 属
 トリコスポロン (*Trichosporon*) 属
 クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属
 トルラスポーラ (*Torulaspora*) 属
 バチルス (*Bacillus*) 属
 スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 属
 マイクロコッカス (*Micrococcus*) 属
 エキシグオバクテリウム (*Exiguobacterium*) 属
 ジベレラ (*Gibberella*) 属
 ムコール (*Mucor*) 属

【請求項2】 以下のいずれかの属に属するブレニルアルコール生産能を有する微生物菌をスクアレン合成酵素阻害剤を添加した培地にて培養し、ブレニルアルコールを菌体内外へ生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする、ブレニルアルコールの製造方法。

アンブロジオザイマ (*Ambrosiozyma*) 属
 シストフィロバシジウム (*Cystofilobasidium*) 属
 メトシュニコビア (*Metschnikowia*) 属
 トリコスボリエラ (*Trichosporiella*) 属
 キサントフィロミセス (*Xanthophyllomyces*) 属
 ブレラ (*Bullera*) 属
 フェロミセス (*Fellomyces*) 属
 フィロバシジウム (*Filobasidium*) 属
 ホルテルマンニア (*Holtermannia*) 属
 ファフィア (*Phaffia*) 属
 ロドトルラ (*Rhodotorula*) 属
 スポリジオボラス (*Sporidiobolus*) 属
 スポロボロミセス (*Sporobolomyces*) 属
 ウィリオプシス (*Williopsis*) 属
 ザイゴアスカス (*Zygoascus*) 属

ロイコスボリジウム (*Leucosporidium*) 属
 ミクソザイマ (*Myxozyma*) 属
 クロッケラ (*Kloeckera*) 属
 ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属
 アルカリゲネス (*Alcaligenes*) 属
 ハロフェラックス (*Haloferax*) 属

【請求項3】 ブレニルアルコールが、ゲラニルゲラニオール、ファルネソール及びネロリドールから選ばれる少なくとも1種である、請求項1又は2に記載の方法。

10 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ファルネシルニリン酸からスクアレンへの生合成を触媒するスクアレン合成酵素を阻害した微生物を用いるブレニルアルコールの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】代表的なブレニルアルコールであるゲラニルゲラニオール及びファルネソールは、生物ではそれぞれゲラニルゲラニルニリン酸及びファルネシルニリン酸がフォスファターゼによって加水分解を受けることにより生成すると考えられる。ゲラニルゲラニルニリン酸は、ゲラニルゲラニオールのニリン酸エステルで、イソペンテニルニリン酸とファネシルニリン酸の縮合又は3分子のイソペンテニルニリン酸とアリールニリン酸の縮合により得られる。ゲラニルゲラニルニリン酸は、環化反応によりジベレリンなどのジテルペンへ、尾部と尾部で縮合してフィトエンを生成したのちカロチノイドへ、またイソペンテニルニリン酸と頭部と尾部で縮合してポリブレニルニリン酸などへと代謝される。一方、ファルネシルニリン酸は、イソペンテニルニリン酸とゲラニルニリン酸の縮合又は2分子のイソペンテニルニリン酸とアリールニリン酸の縮合により生じ、環化反応によりセスキテルペンに、尾部と尾部との縮合によりスクアレンになったのち、ステロイド及びトリテルペンに、またイソペンテニルニリン酸と頭部と尾部で縮合してポリブレニルニリン酸やドリコールに代謝される。また、Ras タンパク質やGタンパク質などのある種のタンパク質のシステインと結合してブレニル化タンパク質に代謝される。このように、ゲラニルゲラニオール、ゲラニルゲラニルニリン酸、及びこれらの前駆体であるファルネシルニリン酸、ファルネソール、ゲラニルニリン酸、ゲラニオールなどの一連のゲラニルゲラニオール誘導体は、テルペン類、カロチノイド類及びステロイド類の生合成中間体として中心的な化合物である。また、ゲラニルゲラニオール誘導体は、香料、抗腫瘍活性を有するタキサン類の製造(特願平8-227481号)、養毛剤(特願平8-180449号)、骨粗鬆症治療剤(特願平9-294089号)など、重要な用途がある。

【0003】ブレニルアルコール生産菌に関しては、これまで、*Saccharomyces cerevisiae*のスクアレン合成酵

素欠損株 (erq9変異株) がファルネソールを分泌生産する例 [Curr.Genet., 18, 41-46 (1990)]があるが、その生産量は少なく (1 mg/L)、実用的生産レベルではない。また、同株がゲラニオゲラニオールを生産した記述はない。

【0004】スクアレン合成酵素欠損株がファルネソールを分泌生産する例は上記 *Saccharomyces cerevisiae* の一例についてのみであり、*Saccharomyces cerevisiae* 以外の他の微生物菌株で、スクアレン合成酵素欠損株が同様にファルネソールを生産することを報告するものはない。また、人為的にスクアレン合成酵素遺伝子を欠損させたり、同酵素活性を阻害剤で阻害させることによって、上記変異株と同様のファルネソール生産が認められるかどうかはこれまで確認されていない。

【0005】一方、HMGCoA還元酵素阻害剤 (S-4522) を添加すると、犬の血清中でファルネソールが $5 \mu\text{g/L}$ 、ヒトの血清中でファルネソールが $6 \mu\text{g/L}$ 検出される [Ana 1., Biochem., 252, 89-95 (1997)]。しかしながら、動物細胞のステロール生産能は高くないことから、HMGCoA還元酵素活性を阻害しても実用上利用できるレベルの生産量は期待できない。また、HMGCoA還元酵素活性阻害剤の添加によって、ゲラニルゲラニオールを生産した記述は同文献にはない。

【0006】さらに、スクアレン合成酵素阻害剤 (squalenstatin-1) を添加すると、ラットの肝臓組織中のファルネシルニリン酸が 5 n mol/q から 110 n mol/q に、また、ゲラニルゲラニルニリン酸が 1.6 n mol/q から 3 n mol/q に増加することが報告されている [Biochimica et Biophysica Acta, 1303, 169-179 (1996)]。しかし、これらはいずれもラジオアイソトープ標識した酢酸を餌に入れた実験でようやく検出できる程度の量であり、実用的レベルではない上、動物細胞を培養するには高価な培地を用いなければならない。また、ファルネソール及びゲラニルゲラニオールが検出されたという記述はない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の課題は、微生物を用いてプレニルアルコールを大量に生産する方法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決すべく検討を重ねた結果、アセチルCoAからファルシルニリン酸を経てスクアレンに至る生合成経路に着目し、そのファルネシルニリン酸からスクアレンへの合成反応を触媒するスクアレン合成酵素を試薬により阻害することによってプレニルアルコール生産能を有する微生物のスクアレン合成酵素活性を低下又は欠失させたところ、プレニルアルコールを菌体内外に大量に合成蓄積できることを見出した。また、さらに驚くべきことに、通常の培養条件ではプレニルアルコールを生産しない微生物菌においても上記と同様な条件で培養することによ

り、当該化合物の生産が可能となることを見だし、本発明を完成させるに至った。

【0009】すなわち、本発明は、以下のいずれかの属に属するプレニルアルコール生産能を有する微生物菌をスクアレン合成酵素阻害剤を添加した培地にて培養し、プレニルアルコールを菌体内外へ生成蓄積せしめ、これを取り出すことを特徴とする、プレニルアルコールの製造方法である。

サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属

10 サッカロミコシス (*Saccharomycopsis*) 属

サッカロミコデス (*Saccharomycodes*) 属

シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*) 属

ウィッカーハミア (*Wickerhamia*) 属

デバリオミセス (*Debaryomyces*) 属

ハンゼニアスポーラ (*Hanseniaspora*) 属

ピキア (*Pichia*) 属

キャンジダ (*Candida*) 属

ザイゴサッカロミセス (*Zygosaccharomyces*) 属

オガタエア (*Ogataea*) 属

20 クライシア (*Kuraishia*) 属

コマガタエラ (*Komagataella*) 属

ヤロウヴィア (*Yarrowia*) 属

クリベロマイセス (*Kluyveromyces*) 属

トリコスボロン (*Trichosporon*) 属

クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属

トルラスポーラ (*Torulaspora*) 属

アンブロジオザイマ (*Ambrosiozyma*) 属

シストフィロバシジウム (*Cystofilobasidium*) 属

メトシュニコビア (*Metschnikowia*) 属

30 トリコスボリエラ (*Trichosporiella*) 属

キサントフィロミセス (*Xanthophyllomyces*) 属

ブレラ (*Bullera*) 属

フェロミセス (*Fellomyces*) 属

フィロバシジウム (*Filobasidium*) 属

ホルテルマンニア (*Holtermannia*) 属

ファフィア (*Phaffia*) 属

ロドトルラ (*Rhodotorula*) 属

スポリジオボラス (*Sporidiobolus*) 属

スポロボロミセス (*Sporobolomyces*) 属

40 ウィリオブシス (*Williopsis*) 属

ザイゴアスカス (*Zygoascus*) 属

ロイコスボリジウム (*Leucosporidium*) 属

ミクソザイマ (*Myxozyma*) 属

クロッケラ (*Kloeckera*) 属

バチルス (*Bacillus*) 属

スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 属

マイクロコッカス (*Micrococcus*) 属

エキシグオバクテリウム (*Exiguobacterium*) 属

ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属

50 アルカリゲネス (*Alcaligenes*) 属

ジベレラ (*Gibberella*) 属

ムコール (*Mucor*) 属

ハロフェラックス (*Haloferax*) 属

上記ブレニルアルコールの製造方法において、ブレニルアルコールとしては、ゲラニルゲラニオール、ファルネソール、ネロリドールなどが挙げられる。

【0010】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明において微生物によって生産されるブレニルアルコールは、主としてゲラニルゲラニオール、ファルネソール、ネロリドールをいうが、それらの前駆体又は類縁体である、ゲラニルゲラニルニリン酸、ファルネシルニリン酸、ゲラニルゲラニルモノリン酸、ゲラニルモノリン酸、ゲラニルニリン酸、ファルネシルモノリン酸、ゲラニルリナノール、リナノールなども包含する。

【0011】本発明においてブレニルアルコールの生産に使用する微生物は、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、サッカロミコシス (*Saccharomycopsis*) 属、サッカロミコデス (*Saccharomycodes*) 属、シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*) 属、ウィッカーハミア (*Wickerhamia*) 属、デバリオミセス (*Debaryomyces*) 属、ハンゼニアスポーラ (*Hanseniaspora*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、キャンジダ (*Candida*) 属、ザイゴサッカロミセス (*Zygosaccharomyces*) 属、オガタエア (*Ogataea*) 属、クライシア (*Kuraishia*) 属、コマガタエラ (*Komagataella*) 属、ヤロウヴィア (*Yarrowia*) 属、クリベロマイセス (*Kluyveromyces*) 属、トリコスポロン (*Trichosporon*) 属、クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属、トルラスポーラ (*Torulaspora*) 属、アンブロジオザイマ (*Ambrosiozyma*) 属、シストフィロバシジウム (*Cystofilobasidium*) 属、メトシュニコビア (*Metschnikowia*) 属、トリコスポリエラ (*Trichosporiella*) 属、キサントフィロミセス (*Xanthophyllomyces*) 属、ブレラ (*Bullera*) 属、フェロミセス (*Fellomyces*) 属、フィロバシジウム (*Filobasidium*) 属、ホルテルマンニア (*Holtremannia*) 属、ファフィア (*Phaffia*) 属、ロドトルラ (*Rhodotorula*) 属、スポリジオボラス (*Sporidiobolus*) 属、スポロボロミセス (*Sporobolomyces*) 属、ウィリオプシス (*Williopsis*) 属、ザイゴアスカス (*Zygoascus*) 属、ロイコスポリジウム (*Leucosporidium*) 属、ミクソザイマ (*Myxozyma*) 属又はクロッケラ (*Kloeckeria*) 属のいずれかの属に属する酵母；バチルス (*Bacillus*) 属、スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 属、マイクロコッカス (*Micrococcus*) 属、エキシグオバクテリウム (*Exiguobacterium*) 属、プレビバクテリウム (*Revibacterium*) 属又はアルカリゲネス (*Alcaligenes*) 属のいずれかの属に属する細菌；ジベレラ (*Gibberella*) 属又はムコール (*Mucor*) 属に属する糸状菌；あるいはハロフェラックス (*Haloferax*) 属に属するアーキアであって、ブレニルアルコールを生産する能力が潜在的

にある菌株であればよい。

【0012】ブレニルアルコール生産能を有する微生物菌を以下に具体的に列挙する。

(1) サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属；

Saccharomyces cerevisiae A451 ATCC200589

Saccharomyces cerevisiae pYHMG044/AURGG101

Saccharomyces cerevisiae pYHMG122/A451

Saccharomyces cerevisiae YPH499 ATCC76625

Saccharomyces cerevisiae pRS434GAP-HMG1/YPH499

10 *Saccharomyces cerevisiae* pRS435GAP-BTS1/YPH499

Saccharomyces cerevisiae 京都大学保存株 4104

Saccharomyces cerevisiae IFO 0538

Saccharomyces cerevisiae 京都大学保存株 4045

Saccharomyces cerevisiae IFO 0565

Saccharomyces cerevisiae IFO 0210

Saccharomyces cerevisiae ATCC 64031

Saccharomyces cerevisiae var. *ellipsoides* 京都大学保存株 4103

Saccharomyces cerevisiae IFO 0258

20 *Saccharomyces cerevisiae* IFO 2347

Saccharomyces unisporus IFO 0215

Saccharomyces kluyveri IFO 1892

Saccharomyces ellipsoideus 京都大学保存株 4102

Saccharomyces Hafe logos van Laer 京都大学保存株 4003

Saccharomyces transvaalensis IFO 1625

【0013】(2) サッカロミコシス (*Saccharomycopsis*) 属；

Saccharomycopsis fibuligera IFO 1665

Saccharomycopsis fibuligera IFO 0107

Saccharomycopsis fibuligera IFO 1744

Saccharomycopsis fibuligera IFO 0105

Saccharomycopsis fibuligera IFO 10829

Saccharomycopsis fermentans IFO 10772

Saccharomycopsis javaensis IFO 1848

Saccharomycopsis lipolytica IFO 1209

Saccharomycopsis schoenii IFO 10683

Saccharomycopsis synnaedendra IFO 1604

Saccharomycopsis vini IFO 1748

40 【0014】(3) サッカロミコデス (*Saccharomycodes*) 属；

Saccharomycodes ludwigii IFO 0339

Saccharomycodes ludwigii IFO 10036

Saccharomycodes sinensis IFO 10111

【0015】(4) シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*) 属；

Schizosaccharomyces pombe IFO 0346

Schizosaccharomyces pombe IFO 0638

Schizosaccharomyces octosporus IAM 4842

50 【0016】(5) ウィッカーハミア (*Wickerhamia*)

属:

Wickerhamia fluorescens IFO 1116

Wickerhamia domerqiae IFO 1857

【0017】(6) デバリオミセス (*Debaryomyces*) 属:

Debaryomyces vanrijae var *vanrijae* JCM 2169

Debaryomyces castellii IFO 1359

Debaryomyces occidentalis IFO 1842

【0018】(7) ハンゼニアスポーラ (*Hanseniaspora*) 属:

Hanseniaspora valbyensis IFO 0115

Hanseniaspora valbyensis IFO 1758

Hanseniaspora guilliermondii IFO 1411

Hanseniaspora uvarum IFO 10833

【0019】(8) ピキア (*Pichia*) 属:

Pichia pastoris GS115 ATCC 20864

Pichia capsulata IFO 0984

Pichia henricii IFO 1477

Pichia holstii IFO 0980

Pichia naganishii IFO 1670

Pichia rhodanensis IFO 1272

Pichia saitoi IAM 4945

Pichia burtonii IFO 10837

Pichia misumaiensis IFO 10221

Pichia ofunaensis IFO 10709

Pichia pijperi IFO 1290

Pichia anomala IFO 0146

Pichia fabianii IFO 1254

Pichia farinosa IFO 1003

Pichia jadinii IFO 0987

Pichia polymorpha IFO 0195

Pichia silvicola IFO 0807

【0020】(9) キャンジダ (*Candida*) 属:

Candida glabrata IFO 0005

Candida glabrata IFO 0622

Candida glabrata IFO 0741

Candida cariosilignicola IFO 1910

Candida kefyr IFO 0432

Candida kefyr IFO 0706

Candida salani IFO 0762

Candida versatilis IFO 1941

Candida versatilis IFO 10664

Candida diddensiae IFO 1970

Candida nitratophila IFO 10004

Candida kruisii IFO 10255

Candida krusei IFO 0013

Candida krusei IFO 0941

Candida norvegica IFO 10302

Candida mogii IFO 0436

Candida guilliermondii IFO 0437

Candida guilliermondii IFO 0566

Candida utilis IFO 0639

Candida utilis IFO 0619

Candida stellata IFO 0857

Candida catenulata IFO 0720

Candida fragicola IFO 1574

Candida lambica IFO 1146

Candida maltosa IFO 1977

Candida mycoderma IFO 0164

Candida parapsilosis IFO 0708

10 *Candida rugosa* IFO 0591

Candida succiphila IFO 1911

Candida tropicalis IFO 0006

Candida zeylanoides IFO 0719

Candida albicans IFO 1060

Candida intermedia IFO 0761

Candida tenuis IFO 0716

【0021】(10) ザイゴサッカロミセス (*Zygosaccharomyces*) 属:

Zygosaccharomyces rouxii IFO 0439

20 *Zygosaccharomyces rouxii* IFO 0740

Zygosaccharomyces japonicus IFO 0595

【0022】(11) オガタエ (*Ogataea*) 属:

Ogataea glucozyma IFO 1472

Ogataea polymorpha IFO 1475

(12) クライシア (*Kuraishia*) 属:

Kuraishia capsulata IFO 0974

【0023】(13) コマガタエラ (*Komagataella*) 属:

Komagataella pastoris IFO 0948

(14) ヤロウヴィア (*Yarrowia*) 属:

30 *Yarrowia lipolytica* IFO 0717

Yarrowia lipolytica IFO 0746

【0024】(15) クリベロマイセス (*Kluyveromyces*) 属:

Kluyveromyces lactis IFO 0648

Kluyveromyces lactis IFO 0433

Kluyveromyces marxianus IFO 0617

【0025】(16) トリコスポロン (*Trichosporon*) 属:

Trichosporon cutaneum IFO 0173

40 *Trichosporon cutaneum* 京都大学保存株4869

Trichosporon cutaneum IFO 1198

Trichosporon brassicae IFO 1584

Trichosporon pullulans IFO 1232

Trichosporon penicillatum JCM 2171

【0026】(17) クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属:

Cryptococcus humicola IFO 1527

Cryptococcus albidus IFO 0434

Cryptococcus albidus IFO 1044

50 *Cryptococcus albidus* IFO 0881

Cryptococcus humicola IFO 0753
Cryptococcus terreus IFO 0727
Cryptococcus glutinis IFO 1125
 【0027】(18) トルラスポーラ (*Torulaspora*) 属;
Torulaspora delbrueckii IFO 0876
Torulaspora delbrueckii IFO 1626
 【0028】(19) アンブロジオザイマ (*Ambrosiozyma*) 属
Ambrosiozyma ambrosiae IFO 10835
Ambrosiozyma monospora IFO 10751
Ambrosiozyma philentoma IFO 1847
Ambrosiozyma platypodis IFO 10752
 【0029】(20) シストフィロバシジウム (*Cystofilobasidium*) 属
Cystofilobasidium infirmominiatum IFO 1057
 (21) メトシュニコビア (*Metschnikowia*) 属
Metschnikowia hawaiiensis IFO 10791
Metschnikowia krissii IFO 1677
Metschnikowia lunata IFO 1605
Metschnikowia pulcherrima IFO 0863
 【0030】(22) トリコスポリエラ (*Trichosporiella*) 属
Trichosporiella flavificans IFO 1573
 (23) キサントフィロミセス (*Xanthophyllomyces*) 属
Xanthophyllomyces dendrorhous IFO 10130
 【0031】(24) ブレラ (*Bullera*) 属
Bullera crocea IFO 10113
Bullera sinensis IFO 10756
Bullera pseudoalba IFO 10179
 【0032】(25) フェロミセス (*Fellomyces*) 属
Fellomyces penicillatus IFO 10119
 (26) フィロバシジウム (*Filobasidium*) 属
Filobasidium capsuligenum IFO 1185
Filobasidium uniguttulatum IFO 0699
 【0033】(27) ホルテルマンニア (*Holtermannia*) 属
Holtermannia corniformis IFO 10742
 (28) ファフィア (*Phaffia*) 属
Phaffia rhodozyma ATCC 66270
 【0034】(29) ロドトルラ (*Rhodotorula*) 属
Rhodotorula glutinis IFO 0695
Rhodotorula minuta IFO 0715
Rhodotorula rubra IFO 0870
Rhodotorula aurantinaca IFO 0951
 【0035】(30) スポリジオボラス (*Sporidiobolus*) 属
Sporidiobolus salmonicolor IFO 1035
 (31) スポロボロミセス (*Sporobolomyces*) 属
Sporobolomyces salmonicolor IFO 0374
 【0036】(32) ウィリオプシス (*Williopsis*) 属

Williopsis californica IFO 0800
Williopsis saturnus IFO 0895
Williopsis saturnus IFO 0941
Williopsis saturnus var. *saturnus* IFO 0125
 【0037】(33) ザイゴアスカス (*Zygopascus*) 属
Zygopascus hellenicus IFO 10184
 (34) ロイコスボリジウム (*Leucosporidium*) 属
Leucosporidium scottii IFO 1924
 【0038】(35) ミクソザイマ (*Myxozyma*) 属
 10 *Myxozyma lipomycoideus* IFO 10351
 (36) クロッケラ (*Kloeckera*) 属
Kloeckera africana IFO 0868
Kloeckera apiculata IFO 0151
Kloeckera cortis IFO 0633
 【0039】(37) バチルス (*Bacillus*) 属;
Bacillus amyloliquefaciens IFO 3032
Bacillus pumilus IFO 3030
 【0040】(38) スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 属;
 20 *Staphylococcus epidermidis* IFO 3762
Staphylococcus aureus IFO 3060
 【0041】(39) マイクロコッカス (*Micrococcus*) 属;
Micrococcus luteus IFO 3067
 (40) エキシグオバクテリウム (*Exiguobacterium*) 属;
Exiguobacterium acetylicum IFO 12146
 【0042】(41) ブレバクテリウム (*Brevibacterium*) 属
Brevibacterium divaricatum NRRL2311
 30 *Brevibacterium fuscum* IFO12127
Brevibacterium linens IFO12171
 【0043】(42) アルカリゲネス (*Alcaligenes*) 属
Alcaligenes faecalis IFO 13111
 (43) ジベレラ (*Gibberella*) 属;
Gibberella fujikuroi IFO 30336
 【0044】(44) ムコール (*Mucor*) 属;
Mucor javanicus IFO 4570
 (45) ハロフェラックス (*Haloferax*) 属
Haloferax volcanii IFO 14742
 40 【0045】その他、本発明で用いることのできるゲラ
 ニルゲラニオール、ファルネソール及び/又はネロリド
 ール等のブレニルアルコールを生産する微生物として
 は、アシクロコニジウム (*Aciculoconidium*) 属、ベン
 シントニア (*Bensingtonia*) 属、ボツリオザイマ (*Botryozyma*) 属、ブレッタノミセス (*Brettanomyces*) 属、
 シテロミセス (*Citeromyces*) 属、クラビスボラ (*Clavispora*) 属、デッケラ (*Dekkera*) 属、ディポダスカス
 (*Dipodascus*) 属、エレマスカス (*Eremascus*) 属、エ
 レモテシウム (*Eremothecium*) 属、エリスロバシジウム
 50 (*Erythrobasidium*) 属、ハンセヌラ (*Hansenula*) 属、

イサチェンキア (*Issatchenkia*) 属、クロッケラスボラ (*Kloeckeraspora*) 属、ココバエラ (*Kockovaella*) 属、コダマエア (*Kodamaea*) 属、クルツマノミセス (*Kurtzmanomyces*) 属、ロデロミセス (*Lodderomyces*) 属、マラセジア (*Malassezia*) 属、モルティエラ (*Mortierella*) 属、マラキア (*Mrakia*) 属、ナドソニア (*Nadsonia*) 属、ナカザワエア (*Nakazawaea*) 属、パシソレン (*Pachysolen*) 属、ロドスポリジウム (*Rhodospiridium*) 属、サツルニスボラ (*Saturnispora*) 属、シゾブラストスポリオン (*Schizoblastosporion*) 属、スポロバキダミア (*Sporopachydermia*) 属、ステファノアスカス (*Stephanosascus*) 属、ステリマトミセス (*Sterigmatomyces*) 属、ステリマトスポリジウム (*Sterigmatosporidium*) 属、シンポジオミセス (*Sympodiomyces*) 属、シンポジオミコシス (*Sympodiomyces*) 属、トリゴノプシス (*Trigonopsis*) 属、ツチャエア (*Tsuchiyaea*) 属、ツカムレラ (*Tsukamurella*) 属、ヤマダザイマ (*Yamadazyma*) 属、ジゴザイマ (*Zygozima*) 属等に属する微生物が挙げられる。また、本発明で用いる微生物は、上記に掲げた天然より採取した菌に、遺伝子を導入して改変を加えた組換え菌をも包含する。

【0046】次に本発明で用いる微生物の培養について説明する。微生物を培養する培地としては通常、これらの微生物が生育し得る培地であれば良く、具体的には、酵母菌 (子囊菌酵母類、不完全酵母類、担子酵母類) の場合、酵母の培養に一般的なDifco社製YM培地、KY培地、YPD O培地等が、細菌・放線菌・糸状菌・アーキアの場合、KB培地、LBO培地、HVO培地等が例示される。

【0047】炭素源としては菌体が資化し生育できる炭素化合物であればいずれでも使用可能である。窒素源としては、例えば、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム等の無機窒素源、酵母エキス、ペプトン、肉エキスなどの有機窒素源を使用することができる。これらの他に、必要に応じて、無機塩類、金属塩、ビタミンなどを添加することもできる。

【0048】培養は、微生物の種類によって異なるが、通常は、温度20~40℃、より好ましくは25~35℃にてpH 5~9で行うことが好ましい。また、微生物の種類に応じて嫌気下でも好気下でもいずれも行うことができるが、増殖速度が速いことから好気下での振盪培養や回転培養が好ましい。但し、培養条件は、用いる微生物や培地組成などに応じてブレニルアルコールの生産量が最大になるように設定することが重要であることは当然である。

【0049】本発明においては、ブレニルアルコールの生産量を増大させるために、ブレニルアルコール生産能を有する微生物菌のスクアレン合成酵素活性を低下又は欠失させる。スクアレン合成酵素活性の低下又は欠失は、具体的にはスクアレン合成酵素阻害剤を培地に添加

することにより行う。またスクアレン生産能を有する微生物が有するスクアレン合成酵素遺伝子を人為的に破壊又は改変することによっても行うことができる。

【0050】スクアレン合成酵素阻害剤を培地に添加し培養を行う場合、用いるスクアレン合成酵素阻害剤としては、特に限定されないが、例えばBSM; BSM-187745 (*Toxicology and applied pharmacology*, 1987, 145, 91-98, USP 5470845-A)、SQAD (特表平8-508245号公報) 等が挙げられる。

【0051】阻害剤の添加量としては培地に対し、約0.001~0.02%で培養開始時に添加すればよく、好ましくは0.005~0.02%がよい。これらの阻害剤は培養開始時に添加し培養することが好ましいが、培養途中で添加することによっても効果が得られる。

【0052】本発明においてブレニルアルコールを生産する工程は、バッチ式でも、また、バイオリクターを用いた連続式でも可能である。微生物菌体はそのままブレニルアルコールの生産に供してもよいし、破碎菌体、菌体培養液、粗酵素、精製酵素等の菌体処理物としてもよい。また、培養菌体又は該菌体処理物は、固定化法で固定化してもよい。かかる菌体又は菌体処理物を培養することによって、ブレニルアルコールを菌体中又は培養上清中に生成蓄積せしめ、これ採取する。

【0053】培養上清画分からブレニルアルコールを採取するには、遠心分離にて菌体を除去した後、得られた上清に塩化マグネシウムを含む緩衝液とアルカリフォスファターゼを加えて処理した後、ペンタン、メタノール等の溶剤にて抽出する。また、培養菌体画分からブレニルアルコールを採取するには、遠心分離にて集菌した菌体を破碎し、これに塩化マグネシウムを含む緩衝液とアルカリフォスファターゼを加えて処理した後、ペンタン、メタノール等の溶剤にて抽出する。また、上記の溶剤抽出法に、クロマトグラフィー等公知の精製方法を適宜併用することもできる。

【0054】抽出の際、アルカリフォスファターゼを使用すると、菌体又は培養液中にファルネソール又はゲラニルゲラニオールの前駆体として存在するファルネシルニリン酸又はゲラニルゲラニルニリン酸を加水分解させ、ファルネソール及びゲラニルゲラニオールの生産量を上げるのに有効である。フォスファターゼとしては、種々の酸性、中性及びアルカリ性フォスファターゼが考えられ、大腸菌由来のアルカリフォスファターゼが好ましいが、その他、ポテト酸性フォスファターゼ、麦胚芽酸性フォスファターゼ、子牛腸壁フォスファターゼなどを用いてもよい。酵素反応は培養液1ml当たり数0.1単位~数十単位加え、数時間から一晩かけて酵素反応を行なえばよい。また、10~50%のメタノール等のアルコールを添加して加水分解効率を上げることもできる。

【0055】また、ほとんどの微生物は、内在性フォス

10

20

30

40

50

ファターゼを有することから、若干の生産量は低下するが、フォスファターゼ処理をすることなく、有機溶媒抽出してもよい。なお、本発明において、プレニルアルコールの検出及び定量は、市販のガスクロマトグラフィーにより行い、内部標準の1-ウンデカノールに対するピーク面積比により定量する。

【0056】

【実施例】以下に代表的な実施例を示して本発明の具体的な説明を行うが、これらの実施例は本発明の範囲を限定するものではない。

【参考例1】

(1) 液体培地の調製

各実施例において酵母菌、細菌、放線菌、糸状菌及びびーキアの培養に用いる培地は以下のようにして調製した。なお、エルゴステロール溶液は、エルゴステロール（シグマ社製）20mqを50%ターゲットール（ナラカイ製）を含むエタノール溶液1mlに湯浴中で溶解したものを使用した。

【0057】SG+URA

以下を1L脱イオン水に加え、オートクレーブした。

ガラクトース（ナカライ製）	50g
YNB with Amino Acids（Difco製）	67g
ウラシル（BIO 101 Inc.製）	40mq
エルゴステロール溶液	200μl

【0058】YM

YM broth（Difco製）に200μlのエルゴステロール溶液を加えオートクレーブした。

YM+Ade

YM培地に40mq/Lになるようアデニン（シグマ製）を加え同様に調製した。

【0059】YMO

YM培地に以下を添加し、脱イオン水で1Lにし、オートクレーブした。

グルコース（ナカライ製）	50g
大豆油（ナカライ製）	10ml

【0060】YMO-SSI

YMO培地にフィルター滅菌したスクアレン合成酵素阻害剤SQAD水溶液（2.5mq/ml）を20mq/Lになるように添加した。

YMO-L-SSI

YMO培地に10mlのオリーブオイル（ナラカイ製）を添加し、YMO-SSIと同様にして調製した。

【0061】YPD0-SSI

以下を脱イオン水1Lに溶解し、オートクレーブ滅菌した。滅菌後、十分に培地が冷えてからフィルター滅菌したスクアレン合成阻害剤SQAD水溶液（2.5mq/ml）を20mq/Lになるよう添加した。

Yeast Extract（DIFCO製）	10g
Bactopeptone（DIFCO製）	20g
グルコース（ナラカイ製）	50g

大豆油（ナラカイ製）	10ml
エルゴステロール溶液	200μl

【0062】KY

以下を1Lの脱イオン水に加え、2N水酸化ナトリウム溶液でpH5.5に調整した後、脱イオン水で1Lにし、オートクレーブした。

Malt Extract（DIFCO製）	5g
Yeast Extract（DIFCO製）	5g
エルゴステロール溶液	200μl

10 【0063】KYO

KY培地に以下を添加し、脱イオン水で1Lにし、オートクレーブした。

グルコース（ナカライ製）	50g
大豆油（ナカライ製）	10ml

【0064】KYO-SSI

KYO培地にフィルター滅菌したスクアレン合成酵素阻害剤SQAD水溶液（2.5mq/ml）を20mq/Lになるように添加した。

KB

20 以下を1L脱イオン水に加え、2N水酸化ナトリウム溶液でpH5.5に調整した後、脱イオン水で1Lにし、オートクレーブした。

Bactopeptone（Difco製）	5g
Yeast Extract（Difco製）	5g
グルコース（ナカライ製）	1g
KH ₂ PO ₄ （ナカライ製）	0.7g
K ₂ HPO ₄ （ナカライ製）	0.3g
エルゴステロール溶液	200μl

【0065】KBO

30 KB培地に以下を添加し、脱イオン水で1Lにし、オートクレーブした。

グルコース（ナカライ製）	50g
大豆油（ナカライ製）	10ml

KBO-SSI

KBO培地にフィルター滅菌したスクアレン合成酵素阻害剤SQAD水溶液（2.5mq/ml）を20mq/Lになるように添加した。

【0066】LBO-SSI

40 以下を脱イオン水1Lに溶解し、オートクレーブ滅菌した。滅菌後、十分に培地が冷えてからフィルター滅菌したスクアレン合成阻害剤SQAD水溶液（2.5mq/ml）を20mq/Lになるよう添加した。

Yeast Extract（DIFCO製）	5g
Bactopeptone（DIFCO製）	10g
NaCl（ナラカイ製）	5g
グルコース（ナラカイ製）	50g
大豆油（ナラカイ製）	10ml
エルゴステロール溶液	200μl

【0067】HVO-SSI

50 以下を脱イオン水1Lに溶解し、オートクレーブ滅菌し

た。滅菌後、十分に培地が冷えてからフィルター滅菌したスクアレン合成阻害剤SQAD水溶液(2.5mg/ml)を20mg/Lになるよう添加した。

NaCl (ナラカイ製)	156g
MgCl ₂ · 6H ₂ O (ナラカイ製)	13g
MgSO ₄ · 7H ₂ O (ナラカイ製)	20g
CaCl ₂ · 2H ₂ O (ナラカイ製)	1g
KCl (ナラカイ製)	4g
NaHCO ₃ (ナラカイ製)	0.2g
KBr (ナラカイ製)	0.5g
Yeast Extract (DIFCO製)	5g
グルコース (ナラカイ製)	50g
大豆油 (ナラカイ製)	10ml
エルゴステロール溶液	200μl

【0068】OM+CCC

以下を1Lの脱イオン水に加え、オートクレーブした。

グルコース (ナカライ製)	80g
Yeast Extract (DIFCO製)	5g
NH ₄ NO ₃ (ナカライ製)	12g
KH ₂ PO ₄ (ナカライ製)	1g
MgSO ₄ · 7H ₂ O (ナカライ製)	1g
オートミール (雪印乳業社製)	15g
エルゴステロール溶液	200μl

滅菌後、十分に冷えてからフィルター滅菌した15mg/mlのCysoce1 (GLサイエンス製) 溶液を1ml添加した。

【0069】YPD

以下を1L脱イオン水に加え、オートクレーブした。

グルコース (ナカライ製)	20g
Bactopeptone (Difco製)	20g
Yeast Extract (Difco製)	10g
エルゴステロール溶液	200μl

【0070】(2) 上清画分からのブレニルアルコールの抽出

培養液2.5mlを18φmm×125mm試験管に入れ、ベックマン製遠心分離器GP centrifugeで1000rpm、5分遠心し、上清を新しい18φmm×125mm試験管に移した。6mMの塩化マグネシウムを含むトリス塩酸緩衝液(pH8.0)0.5ml、大腸菌アルカリフォスファターゼ(宝酒造製)5μl(2ユニット)を加え、65℃で30分加熱した。氷上で十分に冷却してからペンタン2ml及びメタノール1mlを加え、十分に混合後、ベックマン製遠心分離器GP centrifugeで1000rpm、5分遠心し、上清を別の新しい試験管に移した。ドラフト内でペンタン・メタノール溶媒を蒸発させた後、300μlのペンタンに再溶解し、GC/MS用バイアル瓶に詰めた。なお、フォスファターゼ処理しない場合は同様の操作をフォスファターゼを加えないで行った。

【0071】(3) 菌体画分からのブレニルアルコールの抽出

① 細菌・アーキアの場合

液体培養液10mlを50mlコーニングチューブに入れ、ベックマン製冷却遠心機(Avant J25-I)で6000rpm、5分遠心分離し菌体を集めた。菌体を脱イオン水0.5mlに懸濁させた後、10mlスピッツ管に移し、東海電機製超音波細胞破碎機UCW-201で破碎した(条件:10℃、1分破碎-30秒停止を20分間繰り返す)。18φmm×125mm試験管に移し、6mMの塩化マグネシウムを含むトリス塩酸緩衝液(pH8.0)0.5mlを加え、上記(2)と同様にフォスファターゼ処理及び抽出を行なった。なお、フォスファターゼ処理しない場合は同様の操作をフォスファターゼを加えないで行った。

【0072】② 酵母・糸状菌の場合

液体培養液2.5mlを18φmm×125mm試験管に入れ、ベックマン製遠心分離器GP centrifugeで1000rpm、5分遠心し菌体を集めた。6mMの塩化マグネシウムを含むトリス塩酸緩衝液(pH8.0)0.5mlを加え菌体を懸濁させた後、破碎用ガラスチューブに移した。等量のガラスビーズ(シグマ製 acid washed 425φ-600μm)を加え、安井機械製Multi-Beads Shocker MB-200で破碎した(条件:室温、2500rpm、20分)。18φmm×125mm試験管に全量に移し、上記(2)と同様にフォスファターゼ処理及び抽出を行なった。なお、フォスファターゼ処理しない場合は同様の操作をフォスファターゼを加えないで行った。

【0073】(4) ブレニルアルコールの全抽出
培養液2mlに1.25mlメタノール(ナカライ)と2mlのペンタン(ナカライ)を加え十分にボルテックスした後、試験管ごと遠心分離した(ベックマン製CP、1500rpm、5分、室温)。ペンタン層を注意深くピペットマン又はバスターピペットでGC/MS用バイアル瓶に移した。この時、内部標準としての10μlウンデカノール溶液(1mg/ml-エタノール)をバイアル瓶にあらかじめ入れておいた。室温に長期保存するとペンタンが揮発するため、分析するまでアルミキャップで封印し-80℃で保存した。

【0074】(5) ブレニルアルコールの分析
ヒューレットパッカード社製HP6890/5973 GC/MSシステムを用い以下の条件で分析した。

① インレット温度: 250℃

② ディテクター温度: 260℃

③ MSゾーン温度

MS Quad: 150℃

MS Source: 230℃

④ スキャンパラメーター

Low Mass: 35

High Mass: 200

Threshold: 40

50 ⑤ インジェクションパラメーター

モード：自動インジェクション
 サンプル量：2 μ l
 洗浄回数：メタノールで3回、ヘキサンで2回
 スプリット比：1：20
 カラム：ヒューレットパッカード社製HP-5MS(0.25mm \times 30M、フィルム厚0.25 μ m)
 キャリヤーガス：ヘリウム1.0ml/min
 ソルベントディレイ：2min
 オープン昇温条件：115°C、1.5分保持
 70/分で250°Cまで昇温、2分保持
 70/分で300°Cまで昇温、7分保持
 ポストタイム 0
 内部標準：1-ウンデカノール/エタノール溶液(1 μ l/ml)を各バイアルに10 μ l添加注入入口ライナー：スプリット/スプリットレスライナー解析：TICを取り込んだ後、69マスをセレクションし1-ウンデカノール(RT=3.39min)、ネロリドール(RT=3.86min)、ファルネソール(RT=4.23min)、ゲラニルゲラニオール(RT=5.78min)のピーク面積を積分した。内部標準のウンデカノールに対するピーク面積比より定量した。
 【0075】〔参考例2〕組換え酵母菌の調製

10x ExTaq バッファー (宝酒造)	5 μ l
2.5 mM dNTPミックス	4 μ l
5 u/ μ l ExTaq (宝酒造)	1 μ l
10 pmol プライマー 1	
10 pmol プライマー 2	
0.5 ng cDNA	

計50 μ lにする

PCR後、アガロースゲル電気泳動により、目的の位置(3.2kbp)に断片が確認されたので、その3.2kbpのDNA断片をTAクローニング可能なpT7Blue Tベクター (Novagen, Madison, WI) にクローニングし、これをpT7HMG1とした。

【0078】(2) pYHMG122の作製

上記(1)で作製したpT7HMG1をBamHI、SalI及びScaI処理してMG-CoA還元酵素をコードする遺伝子HMG1'を取り出し、これをpYES2 (Invitrogen, Carlsbad, CA) のBamHI-XhoI部位に導入した。得られた組換えベクターをpYES-HMG1とした。なお、pYES2は、複製起点として酵母2 μ m DNAのori、及びガラクトースで誘導可能なGAL1転写プロモーターをもつ酵母発現用シャトルベクターである。

【0079】次に、HMG-CoA還元酵素触媒部位と考えられている部分より上流の領域をコードする塩基配列を欠損させた欠失型HMG-CoA還元酵素遺伝子発現ベクターを作製するため、pYES-HMG1を鋳型として、PCR法でベクター部分とともにHMG1'コード領域の一部分を欠失させた断片を作製した。得られた断片をKlenow酵素で平滑末端にした後、セルフライゲーションにより再び環化し、E.

*【1】欠失型HMG-CoA還元酵素遺伝子導入ベクター (pYHMG122) の作製

(1) PCRによるHMG-CoA還元酵素遺伝子 (HMG1'遺伝子) のクローニング

S. cerevisiae HMG1'遺伝子クローニングは、以下のように行った。GenBankにあるS. cerevisiae由来HMG1遺伝子 (アクセッションナンバーM22002) (M. E. Basson, et al., Mol. Cell. Biol. 8, 3797-3808 (1988):配列番号1) の情報をもとに、コードしているタンパク質のN末端、C末端に該当する塩基配列部分のプライマーを作製し、これを用いて酵母のcDNAライブラリー (Clontech製No.CL7220-1, S. cerevisiae DBY746由来) を鋳型としたPCRを行った。

【0076】N末端側プライマー (プライマー1) : 5'-ATG CCG CCG CTA TTC AAG GGA CT-3' (配列番号2)
 C末端側プライマー (プライマー2) : 5'-TTA GGA TTT AAT GCA GGT GAC GG-3' (配列番号3)

PCRは、以下の反応液中、94°C 45秒の変性、55°C 1分のアニーリング及び72°C2分の伸長を1サイクルとしてこれを30サイクル行った。

*【0077】

30 coli JM109へ形質転換させ、プラスミドDNAを作製した。プライマーとして使用した合成DNA配列は以下の通りである。

【0080】5'-TTT CAG TCC CTT GAA TAG CCG CCG GAT -3' (配列番号4)

5'-TCT GAT CGT TTA CCA TAT AAA AAT TAT-3' (配列番号5)

得られたベクターをpYHMG122とした。本ベクターは、N末端より663アミノ酸が欠失したHMG-CoA還元酵素遺伝子を発現することができる。

40 【0081】〔2〕HMG-CoA還元酵素遺伝子HMG1をプラスミドpRS434GAPに連結したベクター (pRS434GAP-HMG1) の作製

(1) pRS405Tcyc、pRS404Tcycの作製 (pRSベクターへCYC1t断片の挿入)

CYC1転写ターミネーターCYC1t断片は、以下の組み合わせのプライマーを用いPCRを行って作製した。

【0082】(プライマー)

① CYC1t-XK

XhoI-Tcyc1FW: 5'-TGC ATC TCG AGG GCC GCA TCA TGT A AT TAG-3 (配列番号6)

KpnI-Tcyc1RV: 5'-CAT TAG GTA CCG GCC GCA AAT TAA A
GC CTT CG-3' (配列番号7)

② CYC1tXA

XhoI-Tcyc1FW: 5'-TGC ATC TCG AGG GCC GCA TCA TGT A
AT TAG-3' (配列番号8)

ApaI-Tcyc1RV: 5'-CAT TAG GGC CCG GCC GCA AAT TAA A
GC CTT CG-3' (配列番号9)

【0083】(PCR条件)

鋳型: pYES2 (Invitrogen社製) 0.1 μg

プライマー: 50 pmol primer DNA

反応液: 1 × pfu buffer with MgSO₄ (Promega, Madison, WI), 10 nmol dNTP, 1.5 u Pfu DNA polymerase (Promega製), 1 μl perfect match polymerase enhancer (Stratagene製)

を含む50 μl 溶液

反応: 95°C 2分 (95°C, 45秒, 60°C, 30秒, 72°C, 1分)
×30サイクル72°C 5分, 4°Cストック

上記②で増幅したDNAそれぞれ、XhoIとKpnI、又はXhoIとApaIで切断し、アガロースゲル電気泳動で260 bpのDNA断片を精製し、CYC1t-XK及びCYC1tXAとした。pRS405 (Stratagene製)のXhoI-KpnI部位にCYC1t-XKを、pRS404 (Stratagene製)のXhoI-ApaI部位にCYC1tXAを挿入し、それぞれpRS405Tcyc及びpRS404Tcycとした。

【0084】(2) 転写プロモーター (TDH3p) の調製
Saccharomyces cerevisiae YPH499 (Stratagene社製) ゲノムDNAを酵母ゲノムDNA調製用キット「Genとるくん」(宝酒造製)で調製し、同ゲノムを鋳型にしてPCRを用い、TDH3p (PGK) プロモーターを含むDNA断片を調製した。

【0085】(プライマー)

DNAプライマー 100 pmol

SacI-Ptdh3FW: 5'-CAC CGA GCT CCA GTT CGA GTT TAT C
AT TAT CAA-3' (配列番号10)

SacII-Ptdh3RV: 5'-CTC TCC GCG GTT TGT TTG TTT ATG
TGT GTT TAT TC-3' (配列番号11)

【0086】(PCR条件)

鋳型: Saccharomyces cerevisiae YPH499 (Stratagene製)

ゲノムDNA 0.46 μg 反応溶液: 1 × ExTaq buffer (Takara), 20 nmol dNTP, 0.5 u ExTaq DNA polymerase (Takara), 1 μl perfect match polymerase enhancerを含む100 μl 溶液

反応: 95°C 2分 (95°C, 45秒, 60°C, 1分, 72°C, 2分) ×30サイクル72°C 4分, 4°Cストック

増幅したDNAをSacIとSacIIで切断し、アガロースゲル電気泳動で680 bpのDNA断片を精製し、TDH3pとした。

【0087】(3) 2 μ DNA複製開始領域 (2 μ OriSN) の調製

pYES2 (Invitrogen社製) をSspIとNheIで切断後、2 μ DNA複製開始点 (2 μ ori) を含む1.5 kbp断片をアガロース

ゲル電気泳動により精製し、Klenow酵素で平滑末端化し、このDNA断片を2 μ OriSNとした。

【0088】(4) YEp型発現ベクター (pRS434GAP、pRS435GAP) の作製

pRS404Tcyc及びpRS405TcycをBAP (bacterial alkaline phosphatase, Takara) 処理したNaeI部位に2 μ OriSNを挿入し、E. coli SURE2に形質転換後、プラスミドDNAを作製した。これを、DraIIIとEcoRI、HpaI、又は、PstIとPvuIIにより切断後アガロースゲル電気泳動し、2 μ oriの挿入とその向きをチェックした。作製したpRS404 Tcyc及びpRS405TcycにpYES2と同じ向きに2 μ oriが挿入されたプラスミドをそれぞれpRS434Tcyc2 μ Ori及びpRS435Tcyc2 μ Oriとした。プラスミドpRS434Tcyc2 μ Ori及びpRS435Tcyc2 μ Oriの2種のプラスミドのSacI-SacII部位に転写プロモーターを含む断片TDH3pを挿入し、pRS434GAP及びpRS435GAPをそれぞれ得た。前記【1】(1)のpT7 HMG1をSmaIとSalIで切断後、アガロースゲル電気泳動で3.2 kbpのHMG1 遺伝子断片を精製した。これをpRS434GAPのSmaI-SalI部位へ挿入し、pRS434GAP-HMG1を得た。

【0089】[3] GGPP合成酵素遺伝子BTS1をプラスミドpRS434GAPに連結したベクター (pRS434GAP-BTS1) の作製

(1) ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素遺伝子BTS1のクローニング

S. cerevisiaeのGGPP合成酵素遺伝子 BTS1遺伝子 (配列番号12) のクローニングは、以下のように行った。GenBankにあるS. cerevisiae由来GGPP合成酵素遺伝子 (アクセッションナンバーU31632) (Y. Jiang, et al., J. Biol. Chem. 270 (37), 21793-21799 (1995)) の情報をもとにN末端、C末端にするプライマーを作製し、これを用いて酵母のcDNAライブラリー (CL7220-1) を鋳型としたPCRを行った。

【0090】N末端側プライマー: 5'-ATG GAG GCC AAG
ATA GAT GAG CT-3' (配列番号13)

C末端側プライマー: 5'-TCA CAA TTC GGA TAA GTG GTC
TA-3' (配列番号14)

PCRは、Perfect match (Stratagene)を使用し、94°C 45秒の変性、55°C 1分のアニーリング及び72°C 2分の伸長を1サイクルとしてこれを30サイクル行った。目的の断片 (約1.0 kbp) が確認されたので、BTS1断片をTAクローニング可能なpTSBlueTベクターにクローニングした。

【0091】(2) pRS435GAP-BTS1の作製

上記(1)のpT7BlueTベクターをBamHI、SalI処理してBTS1断片を取り出し、これをpYES2 (Invitrogen社)のBamHI、XhoIサイトに導入した。得られた組換えベクターをpYESGGPSとした。pYESGGPSをBamHIとMluIで切断し、アガロースゲル電気泳動により1.3 kbp断片を精製した。これを前記【2】(4)のpRS435GAPのBamHI-MluIに挿入し、pRS435GAP-BTS1とした。

【0092】[4] 形質転換体の調製

得られたpYHMG122、pRS434GAP-HMG1及びpRS435GAP-BTS1について、pYHMG122は*Saccharomyces cerevisiae* A451 (ATCC 200598) に、pRS434GAP-HMG1とpRS435GAP-BTS1は*Saccharomyces cerevisiae* YPH499 (Stratagene製) に、“Introduction of DNA into Yeast Cells”, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Son, Inc., pp.13.7.1-13.7.2 (contributed by Daniel M. Becher and Victoria, Lundblad) に記載の酢酸リチウム法又はFrozen-EZ Yeast Transformation II (Zymo Research, Orange, CA) を用いてそれぞれ導入し、pYHMG122/A451、pRS434GAP-HMG1/YPH499及びpRS435GAP-BTS1/YPH499を得た。

【0093】〔実施例1〕スクアレン合成酵素阻害剤添加培地を用いた、*Candida glabrata* IFO 0005株によるブレニルアルコールの生産

(1) 菌株

Candida glabrata IFO 0005株を使用した。

③ Jarfermenter培養

バイオット社製1L培養装置BMJ-01P1を用い以下の培養条件で培養した。

ブレカルチャー：*Candida glabrata* IFO 0005株をYM培地で培養

植菌量 : 1%

培地 : 以下の組成の600ml培地

グルコース (ナカライ製)	30g
YM broth (Difco製)	12.6g
大豆油 (ナカライ製)	18ml
アデカノール LG109 (旭電化製)	0.6ml
5000X エルゴステロール溶液	120μl
SQA	12mq

培養温度 : 30°C

攪拌数 : 400rpm

通気量 : 1vvm

【0097】*Candida glabrata* IFO 0005株を、5%グルコース、3%大豆油、0.1%アデカノール LG109、0.004%エルゴステロール及び0.002% SQAを添加したYM培地中で30°Cで培養したときの培養プロファイルを図1に示す。図1に示されるように、ファルネソールの生産量は培養時間の経過とともに増大し、最終的には130mq/Lのファルネソールを生産することができた。従って、本株は生育速度が速く量産に向いている。

【0098】〔実施例2〕スクアレン合成酵素阻害剤添加培地を用いた、種々の菌株によるブレニルアルコールの生産

(1) 菌株

IFO、ATCC、JCM、NRRL、IAMより購入した菌株及び京都大学清水研究室保存菌株を使用した。また、組換え酵母pYHMG122/A451、pRS434GAP-HMG1/YPH499及びpRS435GAP-BTS1/YPH499は、上記参考例2に従って調製した。

(2) 阻害剤

BSM: BSM-187745 (Toxicology and applied pharmacology, 1987, 145, 91-98) 又はSQA (特表平8-508245号

* (2) 阻害剤

SQA (特表平8-508245号公報) を使用した。SQAは、脱イオン水に溶解し、フィルター滅菌した。十分に冷えてからオートクレーブ滅菌した培地に規定量添加した。

(3) 5000Xエルゴステロール溶液

エルゴステロール (ナカライ製) 20mqを500μlターゲット (ナカライ製) を含む1mlエタノール溶液に加熱し溶解させた。

【0094】(4) 液体培養

① 前培養

バッフル付き100ml三角フラスコに培地20mlを入れ、スラントより一白金耳植菌し30°C、130rpmで3日間回転培養した。

【0095】② 試験管培養

滅菌した培地2.5mlを18φmm×125mm試験管に前培養液50μlを入れ、振とう培養した。

【0096】

公報) を使用した。いずれも脱イオン水に溶解し、フィルター滅菌した。十分に冷えてからオートクレーブ滅菌した培地に規定量添加した。

【0099】(3) 5000Xエルゴステロール溶液

実施例1と同様に調製した。

(4) 液体培養

前培養及び試験管培養は、実施例1と同様にして行った。Jarfermenter培養は、以下に示すようにして行った。バイオット社製1L培養装置BMJ-01P1を用い以下の培養条件で培養した。

【0100】ブレカルチャー：それぞれの菌株をYM培地で培養

植菌量 : 1%

培地 : 表及び下記に記載する培地を用いた。

培養温度 : 表及び下記に記載する温度にて培養した。

攪拌数 : 400rpm

通気量 : 1vvm

結果を、表1から表7に示す。

【0101】

* * 【表1a】

菌株	培地	阻害剤	濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	培養上清成分 ($\mu\text{g}/\text{L}$ 培養液)		
				NE	FOH	GGOH
Saccharomyces cerevisiae A451(ATCC200589)	SG+URA	SQAD	0	20.1	8.0	0.0
			1	19.8	12.5	7.1
			40	50.3	34.1	8.7
		BMS	1	20.1	19.4	5.8
			40	808.2	833.0	20.3
Saccharomyces cerevisiae pYHMG044/AURCG101	SG+URA	SQAD	0	1675.4	3209.5	143.5
			1	2587.6	4402.8	257.4
			40	5015.2	7600.6	489.3
		BMS	1	3445.0	5866.4	271.6
			40	1646.8	3418.3	63.7
Saccharomyces cerevisiae pYHMG122/A451	SG+URA	SQAD	0	56.6	54.7	122.2
			1	51.2	59.5	141.8
			40	154.8	212.8	209.3
		BMS	1	54.5	63.5	121.7
			40	2662.4	3410.3	478.1
Saccharomyces cerevisiae YPH499(ATCC76625)	YM+Ade	SQAD	0	0.0	10.9	14.4
			1	0.0	18.0	17.1
			40	0.0	50.4	14.6
		BMS	1	0.0	49.5	34.9
			40	0.0	627.9	62.2
Saccharomyces cerevisiae pRS434GAP- HMG1/YPH499	YM+Ade	SQAD	0	0.0	30.0	42.9
			1	0.0	49.5	26.2
			40	0.0	407.5	126.7
		BMS	1	0.0	54.9	50.7
			40	0.0	258.0	47.5
Saccharomyces cerevisiae pRS435GAP- BTS1/YPH499	YM+Ade	SQAD	0	5.4	27.4	464.3
			1	6.6	32.9	480.6
			40	11.0	86.4	374.8
		BMS	1	9.1	39.0	614.3
			40	7.0	45.6	518.8

NE:ネロリドール FOH:ファルネソール GGOH:ゲラニオゲラニオール

Saccharomyces fibuligera (IFO 1666)	YM	SQAD	0	0.0	0.0	0.0
			1	0.0	0.0	0.0
			40	0.0	18.4	61.7
		BMS	1	0.0	0.0	15.5
			40	0.0	74.4	138.6
Trichosporon cutaneum (IFO 0173)	KY	SQAD	0	0.0	0.0	0.0
			1	0.0	0.0	0.0
			40	0.0	5.7	0.0
		BMS	1	0.0	0.0	0.0
			40	0.0	7.8	0.0
Saccharomyces cerevisiae (京都大学保存株 4104)	KY	SQAD	0	0.0	12.4	0.0
			1	0.0	0.0	10.0
			40	0.0	0.0	39.9
		BMS	1	0.0	0.0	18.1
			40	0.0	11.5	18.8
Candida glabrata (IFO 0005)	YMO	SQAD	0	0.0	195.9	82.5
			1	2.3	344.5	106.6
			40	18.3	2149.4	73.4
		BMS	1	10.5	2396.6	76.4
			40	57.9	7148.3	56.1
Gibberella fujikuroi (IFO 30636)	OM+CCC	SQAD	0	-	-	-
			1	-	-	-
			40	-	-	-
		BMS	1	-	-	-
			40	-	-	-

NE:ネロリドール FOH:ファルネソール GGOH:グラニオグラニオール

【0102】

【表1b】

菌株	培地	阻害剤	濃度 (mg/ml)	菌体成分 ($\mu\text{g/L}$ 培養液)		
				NE	FOH	GGOH
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> A451(ATCC200689)	SG+URA	SQAD	0	0.0	0.0	3.5
			1	0.0	0.0	11.0
			40	0.0	0.0	0.0
		BMS	1	0.0	0.0	0.0
			40	25.3	130.1	28.3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> pYHMG044/AURGG101	SG+URA	SQAD	0	56.9	562.0	167.7
			1	93.8	590.1	213.2
			40	71.6	320.2	141.7
		BMS	1	92.5	580.8	243.4
			40	59.4	1051.9	326.5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> pYHMG122/A451	SG+URA	SQAD	0	0.0	0.0	5.3
			1	0.0	0.0	2.9
			40	0.0	0.0	5.3
		BMS	1	0.0	0.0	5.9
			40	15.0	124.5	43.1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPH499(ATCC76625)	YM+Ade	SQAD	0	0.0	0.0	0.0
			1	0.0	0.0	0.0
			40	0.0	0.0	0.0
		BMS	1	0.0	0.0	0.0
			40	0.0	14.2	0.0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> pRS434GAP- HMG1/YPH499	YM+Ade	SQAD	0	0.0	0.0	0.0
			1	0.0	0.0	0.0
			40	0.0	11.8	5.8
		BMS	1	0.0	0.0	0.0
			40	0.0	15.8	0.0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> pRS435GAP- BTS1/YPH499	YM+Ade	SQAD	0	0.0	0.0	17.6
			1	0.0	0.0	16.6
			40	0.0	0.0	0.0
		BMS	1	0.0	0.0	20.7
			40	0.0	0.0	30.7

NE: ネロリドール FOH: ファルネソール GGOH: グラニオグラニオール

<i>Saccharomycopsis fibuligera</i> (IFO 1665)	YM	SQAD	0	0.0	0.0	0.0
			1	0.0	29.1	57.9
			40	0.0	33.7	50.7
		BMS	1	0.0	0.0	27.8
			40	0.0	54.1	60.1
<i>Trichosporon cutaneum</i> (IFO 0173)	KY	SQAD	0	0.0	0.0	0.0
			1	0.0	0.0	0.0
			40	0.0	0.0	3.4
		BMS	1	0.0	0.0	5.1
			40	0.0	0.0	0.0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (京都大学保存株 4104)	KY	SQAD	0	0.0	0.0	0.0
			1	0.0	0.0	0.0
			40	0.0	0.0	0.0
		BMS	1	0.0	0.0	0.0
			40	0.0	7.8	0.0
<i>Candida glabrata</i> (IFO 0005)	YMO	SQAD	0	0.0	369.6	174.7
			1	0.0	484.1	180.1
			40	55.5	5454.6	110.0
		BMS	1	10.9	1921.8	116.8
			40	74.6	7885.7	133.3
<i>Gibberella fujikuroi</i> (IFO 30335)	OM+CCC	SQAD	0	0.0	0.0	0.0
			1	0.0	0.0	20.6
			40	0.0	0.0	0.0
		BMS	1	0.0	0.0	0.0
			40	0.0	65.8	51.8

NE: ネロリドール FOH: ファルネソール GGOH: グラニオグラニオール

【0103】

* * 【表2】

KB+1%大豆油培地

菌株	SQAD 濃度 (mg/L)	培養上清成分 ($\mu\text{g/L}$ 培養液)			菌体成分 ($\mu\text{g/L}$ 培養液)		
		NE	FOH	GGOH	NE	FOH	GGOH
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (IFO 3082)	0	0.0	11.6	0.0	0.0	0.0	0.0
	20	0.0	22.4	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Bacillus pumilus</i> (IFO 3030)	0	0.0	21.9	0.0	0.0	0.0	0.0
	20	0.0	86.8	0.0	0.0	6.0	0.0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (IFO 3762)	0	0.0	6.8	0.0	0.0	11.2	0.0
	20	0.0	121.4	0.0	0.0	292.4	0.0
<i>Micrococcus luteus</i> (IFO 3067)	0	0.0	5.1	0.0	0.0	0.0	0.0
	20	0.0	57.3	0.0	0.0	11.8	0.0
<i>Exiguobacterium acetylicum</i> (IFO 12146)	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20	0.0	115.7	0.0	0.0	10.4	0.0

NE: ネロリドール FOH: ファルネソール GGOH: グラニオグラニオール

【0104】

※ ※ 【表3a】

YM 培地

菌株	SQAD 濃度 (mg/L)	日数	培養上清成分 ($\mu\text{g/L}$ 培養液)			菌体成分 ($\mu\text{g/L}$ 培養液)		
			NE	FOH	GGOH	NE	FOH	GGOH
<i>Saccharomyces unisporus</i> (IFO 0215)	0	3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		0.0	3.2	0.0	0.0	0.0	0.0
	0	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (IFO 0538)	0	3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		0.0	0.0	0.0	0.0	8.1	0.0
	0	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Candida glabrata</i> (IFO 0622)	0	3	0.0	3.1	0.0	0.0	1.9	30.4
	1		0.0	3.5	0.0	0.0	1.4	24.3
	20		0.0	243.5	0.0	0.0	212.0	57.0
	0	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		0.0	0.0	0.0	0.0	5.5	40.5
<i>Yarrowia lipolytica</i> (IFO 0717)	0	3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1		0.0	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		0.0	39.7	66.5	0.0	39.7	68.5
	0	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1		0.0	2.1	0.0	0.0	1.5	0.0
	20		0.0	10.6	0.0	0.0	10.6	0.0
<i>Komagataella pastoris</i> (IFO 0948)	0	3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		0.0	3.4	2.3	0.0	3.4	1.8
	0	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

NE: ネロリドール FOH: ファルネソール GGOH: グラニオグラニオール

Kuraishia capsulata (IFO 0974)	0	3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ogataea glucosyza (IFO 1472)	0	3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		0.0	0.0	18.3	0.0	0.0	17.5
	0	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.8
Saccharomyces kluyveri (IFO 1892)	0	3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.9
	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	16.7
	20		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	38.5
	0	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Candida cariosilignicola (IFO 1910)	0	3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.5
	0	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Candida glabrata (IFO 0005)	0	3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	12.0
	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.3
	20		0.0	33.8	2.7	0.0	20.5	53.7
	0	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

NE: ネロリドール FOH: フアルネソール GGOH: グラニオグラニオール

【0105】

【表3b】

YM + 1%大豆油培地

菌株	SQUAD 濃度 (mg/L)	日数	培養上清成分 ($\mu\text{g/L}$ 培養液)			菌体成分 ($\mu\text{g/L}$ 培養液)		
			NE	FOH	GGOH	NE	FOH	GGOH
<i>Saccharomyces undecimus</i> (IFO 0215)	0	3	18.3	8.2	0.0	0.0	0.0	0.0
	1		12.2	5.2	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		67.4	68.4	0.0	0.0	16.9	0.0
	0	7	18.6	14.8	0.0	0.0	0.0	0.0
	1		27.3	17.5	0.0	0.0	0.0	0.0
	20		465.6	433.7	21.6	8.6	255.6	0.0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (IFO 0538)	0	3	0.0	139.3	58.8	0.0	0.0	0.0
	1		0.0	102.9	46.2	0.0	15.0	0.0
	20		65.9	9087.5	331.6	0.0	1465.9	51.0
	0	7	0.0	426.4	248.7	0.0	38.0	0.0
	1		0.0	319.5	241.0	0.0	188.0	85.8
	20		216.2	34241.4	1568.8	18.4	5812.1	286.2
<i>Candida glabrata</i> (IFO 0522)	0	3	0.0	106.1	112.3	0.0	28.8	33.8
	1		9.4	149.2	119.7	0.0	8.7	0.0
	20		422.3	12186.9	327.2	0.0	331.6	9.3
	0	7	11.6	378.3	408.5	0.0	43.7	69.2
	1		17.2	530.0	231.5	0.0	183.3	58.5
	20		1256.9	22147.1	862.7	138.0	2750.6	170.5
<i>Yarrowia lipolytica</i> (IFO 0717)	0	3	0.0	8.7	0.0	0.0	6.7	0.0
	1		2.4	100.1	19.1	0.0	163.3	0.0
	20		19.0	983.3	17.8	0.0	882.1	0.0
	0	7	0.0	95.3	608.0	0.0	0.0	38.4
	1		19.0	405.4	546.8	0.0	0.0	0.0
	20		166.7	6812.9	76.2	0.0	1025.1	41.8
<i>Komagataella pastoris</i> (IFO 0948)	0	3	0.0	78.5	78.9	0.0	13.8	42.3
	1		0.0	82.2	71.5	0.0	22.9	28.4
	20		17.2	2856.2	132.5	0.0	608.4	80.1
	0	7	0.0	101.6	83.5	0.0	4.3	11.0
	1		0.0	569.8	235.7	0.0	53.4	28.2
	20		34.2	5513.3	360.4	0.0	537.5	84.5

NE: ネロリドール FOH: ファルネソール GGOH: グラニオグラニオール

Kuraishia capitata (IFO 0874)	0	3	0.0	24.8	11.1	0.0	3.3	0.0
	1		0.0	1061.9	46.1	0.0	16.1	7.5
	20		0.0	2022.7	262.0	0.0	149.2	34.8
	0	7	0.0	187.5	236.3	0.0	3.3	8.5
	1		0.0	713.7	275.7	0.0	24.8	21.2
	20		35.9	8268.5	680.4	0.0	362.1	89.7
Ogataea glucosyama (IFO 1472)	0	3	0.0	34.8	79.8	0.0	7.4	20.4
	1		0.0	40.5	86.0	0.0	3.7	9.5
	20		0.0	808.8	278.7	0.0	41.1	37.5
	0	7	0.0	63.2	138.8	0.0	0.0	0.0
	1		0.0	98.8	114.7	0.0	0.0	0.0
	20		0.0	1838.0	518.0	0.0	73.7	52.6
Saccharomyces kluyveri (IFO 1892)	0	3	0.0	70.4	46.1	0.0	3.7	0.0
	1		0.0	51.4	23.0	0.0	2.3	0.0
	20		0.0	62.9	30.7	0.0	16.5	0.0
	0	7	0.0	158.5	71.4	0.0	0.0	0.0
	1		23.5	188.8	101.7	0.0	5.0	0.0
	20		44.1	935.3	126.4	0.0	227.8	27.8
Candida carisiolignicola (IFO 1910)	0	3	0.0	11.0	44.7	0.0	0.0	0.0
	1		0.0	20.9	69.3	0.0	0.0	0.0
	20		0.0	124.9	127.1	0.0	8.1	19.6
	0	7	0.0	51.7	182.9	0.0	0.0	0.0
	1		0.0	257.7	867.3	0.0	10.3	37.4
	20		0.0	14378.1	2987.2	0.0	845.5	205.0
Candida glabrata (IFO 0005)	0	3	22.9	552.1	496.1	0.0	50.5	75.2
	1		260.0	8784.9	818.5	8.6	462.0	86.5
	20		2384.0	37518.9	1022.9	428.9	9405.0	306.5
	0	7	77.1	1676.1	434.6	0.0	41.2	51.2
	1		546.0	11218.5	377.8	9.2	381.7	77.1
	20		0.0	0.0	0.0	139.2	2682.5	217.6

NE: ネロリドール FOH: フアルネソール GGOH: グラニオグラニオール

【0106】

* * 【表4a】

大豆油無添加培地

菌株	SQAD 濃度 (mg/L)	培地	培養上清成分 ($\mu\text{g/L}$ 培養液)			菌体成分 ($\mu\text{g/L}$ 培養液)		
			NE	FOH	GGOH	NE	FOH	GGOH
Saccharomyces fibuligera (IFO 0107)	0 20	YM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Saccharomyces fibuligera (IFO 1665)	0 20	YM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Saccharomyces fibuligera (IFO 1744)	0 20	YM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Mucor javanicus (IFO 4570)	0 20	KY	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Saccharomyces Hafslundii van Leeuwen (京都大学保存株 4003)	0 20	KY	0.0	5.0	0.0	0.0	19.3	0.0
Saccharomyces cerevisiae (京都大学保存株 4045)	0 20	KY	0.0	0.0	0.0	0.0	44.9	18.6
Saccharomyces ellipsoideus (京都大学保存株 4102)	0 20	KY	0.0	0.0	0.0	0.0	22.9	7.2
Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus (京都大学保存株 4103)	0 20	KY	0.0	0.0	0.0	0.0	22.6	8.6

NE: ネロリドール FOH: フアルネソール GGOH: グラニオグラニオール

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (京都大学保存株 4104)	0 20	KY	0.0	0.0	0.0	0.0	15.8	81.7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (IFO 0565)	0 20	KY	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	54.7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (IFO 0210)	0 20	KY	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (IFO 0845)	0 20	KY	0.0	4.4	0.0	0.0	18.8	0.0
<i>Ogataea polymorpha</i> (IFO 1475)	0 20	KY	0.0	0.0	0.0	0.0	13.5	35.1
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>vanripii</i> (JCM 2169)	0 20	KY	0.0	73.7	0.0	0.0	14.3	6.2
<i>Saccharomyces ludwigii</i> (IFO 0339)	0 20	KY	0.0	15.3	0.0	0.0	6.0	80.9
<i>Hanseniaspora uvarum</i> var. <i>uvarum</i> (IFO 0115)	0 20	KY	0.0	18.6	0.0	0.0	7.4	103.5
<i>Kluyveromyces fragilis</i> (IFO 0545)	0 20	KY	0.0	6.0	0.0	0.0	6.3	72.9
<i>Candida glabrata</i> (IFO 0005)	0 20	KY	0.0	35.7	5.4	0.0	4.5	28.3
<i>Candida guilliermondii</i> (IFO 0762)	0 20	KY	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	29.0

NE: ネロリドール POH: ファルネソール GGOH: グラニオグラニオール

<i>Cryptococcus humicola</i> (IFO 1527)	0 20	KY	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Wickerhamia fluorescens</i> (IFO 1116)	0 20	KY	0.0	18.7	0.0	0.0	4.2	22.0
<i>Trichosporon cutaneum</i> (京都大学保存株 4869)	0 20	KY	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

NE: ネロリドール POH: ファルネソール GGOH: グラニオグラニオール

1%大豆油添加培地

菌株	BQAD 濃度 (mg/L)	培地	培養上清成分 ($\mu\text{g/L}$ 培養液)			菌体成分 ($\mu\text{g/L}$ 培養液)		
			NE	FOH	GGOH	NE	FOH	GGOH
<i>Saccharomyces</i> <i>fibuligera</i> (IFO 0107)	0 20	YMO YMO- SSI	0.0 0.0	10.8 9.7	155.2 388.5	0.0 0.0	8.1 4.8	24.6 79.9
<i>Saccharomyces</i> <i>fibuligera</i> (IFO 1665)	0 20	YMO YMO- SSI	0.0 0.0	4.7 94.5	211.5 4214.9	0.0 0.0	8.2 20.8	21.7 228.9
<i>Saccharomyces</i> <i>fibuligera</i> (IFO 1744)	0 20	KBO KBO- SSI	0.0 0.0	0.0 41.1	155.5 3870.1	0.0 0.0	0.0 29.8	42.2 819.1
<i>Mucor javanicus</i> (京都大学保存株 3009)	0 20	KYO KYO- SSI	0.0 0.0	0.0 38.8	38.5 343.6	13.4 0.0	22.7 15.6	17.5 61.7
<i>Saccharomyces</i> <i>Hafslundae</i> van Laer (京都大学保存株 4003)	0 20	KYO KYO- SSI	30.1 480.0	511.9 56541.1	694.7 2654.4	0.0 291.8	36.9 7433.0	52.4 710.6
<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> (京都大学保存株 4045)	0 20	KYO KYO- SSI	148.1 24606.3	870.4 37772.7	786.8 2590.6	0.0 3022.8	69.3 7893.0	65.8 534.5
<i>Saccharomyces</i> <i>ellipsoideus</i> (京都大学保存株 4102)	0 20	KYO KYO- SSI	17.5 18180.8	541.1 50245.8	711.3 3207.1	0.0 1350.0	36.4 6358.2	76.3 396.5
<i>Saccharomyces</i> var. <i>ellipsoideus</i> (京都大学保存株 4103)	0 20	KYO KYO- SSI	56.4 20830.8	753.1 53814.6	1072.8 4589.9	0.0 1073.6	591.7 5528.9	39.4 369.6

NE: ネロリドール FOH: ファルネソール GGOH: グラニオグラニオール

<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> (京都大学保存株 4104)	0 20	KYO KYO- SSI	18.5 23620.7	569.2 54713.2	546.0 4589.9	0.0 2409.0	51.6 11464.9	79.2 656.2
<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> (IFO 0665)	0 20	KYO KYO- SSI	0.0 839.9	411.7 45723.6	535.2 2216.6	0.0 1698.7	119.4 4255.2	89.6 183.2
<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> (IFO 0210)	0 20	KYO KYO- SSI	37.5 25251.0	685.5 46795.6	362.8 1627.2	0.0 1698.7	119.4 4255.2	89.6 183.2
<i>Schizosaccharomyces</i> <i>pombe</i> (IFO 0346)	0 20	KYO KYO- SSI	0.0 767.8	186.2 45282.1	278.9 1153.6	0.0 83.1	29.7 4826.5	82.6 159.4
<i>Ogataea</i> <i>polymorpha</i> (IFO 1475)	0 20	KYO KYO- SSI	0.0 0.0	238.9 5642.0	452.7 1196.1	0.0 19.8	31.4 1196.1	126.0 402.7
<i>Devaromyces</i> <i>vauvianae</i> var. <i>vauvianae</i> (JCM 2169)	0 20	KYO KYO- SSI	0.0 129.5	809.8 20359.5	241.4 2238.0	0.0 23.9	67.2 2807.0	54.3 492.8
<i>Saccharomyces</i> <i>hadrigii</i> (IFO 0339)	0 20	KYO KYO- SSI	0.0 131.0	184.4 28489.6	364.3 1483.8	0.0 0.0	41.6 3217.2	114.7 199.4
<i>Hanseniaspora</i> <i>valbyensis</i> <i>valbyensis</i> (IFO 0116)	0 20	KYO KYO- SSI	0.0 182.6	254.9 26907.1	483.6 1217.7	0.0 15.1	25.2 2828.5	76.6 185.9
<i>Kluyveromyces</i> <i>lactis</i> (IFO 0648)	0 20	KYO KYO- SSI	0.0 348.6	138.4 81785.7	433.8 3343.8	0.0 14.5	20.9 1228.6	84.6 225.8
<i>Candida</i> <i>glabrata</i> (IFO 0005)	0 20	KYO KYO- SSI	192.8 15504.1	861.5 44573.8	908.0 2237.1	0.0 1183.0	34.9 4710.9	51.7 279.6
<i>Candida</i> <i>salani</i> (IFO 0762)	0 20	KYO KYO- SSI	37.0 1702.8	274.7 6874.7	384.4 819.1	18.2 231.3	90.5 962.5	128.0 350.0

NE: ネロリドール FOH: ファルネソール GGOH: グラニオグラニオール

Cryptococcus brunellus (IFO 1527)	0	KYO	0.0	16.6	24.7	7.8	16.0	0.0
	20	KYO- SSI	0.0	49.6	33.4	21.2	160.9	51.9
Wickerhamia fluorescens (IFO 1116)	0	KYO	0.0	199.3	315.7	0.0	15.0	88.5
	20	KYO- SSI	73.2	12200.1	1181.6	32.6	4262.8	500.7
Trichosporon cutaneum (京都大学保存株 4969)	0	KYO	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20	KYO- SSI	94.3	843.4	305.2	0.0	51.9	36.0

NE:ネロリドール FOH:ファルネソール GGOH:グラニオグラニオール

【0108】

* * 【表5】

菌株	SQAD 濃度 (mg/L)	培養温 度 (℃)	培養上清成分 (μg/L培養液)			菌体成分 (μg/L培養液)		
			NE	FOH	GGOH	NE	FOH	GGOH
Candida krifyi (IFO 0432)	0	28	10.1	581.5	1090.8	0.0	204.7	313.7
	20		421.3	19088.0	2642.3	38.2	2765.7	345.8
Kluyveromyces lactis (IFO 0433)	0	28	8.4	327.7	1093.1	0.0	28.3	58.4
	20		274.4	15271.7	8628.0	5.7	508.8	80.1
Cryptococcus albida (IFO 0434)	0	24	0.0	43.2	93.0	0.0	0.0	0.0
	20		13.6	2249.9	182.1	0.0	855.3	59.8
Candida mogii (IFO 0436)	0	24	0.0	63.4	243.0	0.0	0.0	29.4
	20		18.1	14165.6	1060.8	0.0	1352.9	147.9
Candida guilliermondii (IFO 0437)	0	24	0.0	31.2	683.0	0.0	0.0	28.6
	20		123.5	17403.1	4167.1	0.0	706.9	131.7
Zygosaccharomyces rouxii (IFO 0439)	0	28	0.0	231.9	380.5	0.0	0.0	3.0
	20		117.8	20311.7	1680.1	0.0	416.4	52.8
Candida utilis (IFO 0639)	0	24	0.0	64.9	211.1	0.0	0.0	19.8
	20		226.1	37750.3	7634.3	31.2	8828.4	1146.4
Kluyveromyces lactis (IFO 0643)	0	28	0.0	477.3	1564.1	0.0	20.2	88.9
	20		608.1	38728.4	5114.6	26.1	4314.9	378.9
Zygosaccharomyces rouxii (IFO 0740)	0	28	0.0	110.4	206.1	0.0	0.0	8.4
	20		143.9	8748.8	799.1	7.7	1896.5	200.6

NE:ネロリドール FOH:ファルネソール GGOH:グラニオグラニオール

<i>Candida stellata</i> (IFO 0857)	0 20	24	0.0 180.5	179.3 6475.2	74.6 569.3	0.0 9.1	0.0 418.6	0.0 46.9
<i>Torulospira delbrueckii</i> (IFO 0876)	0 20	24	0.0 18.9	256.2 3824.8	347.4 659.9	0.0 0.0	0.0 178.0	0.0 17.7
<i>Cryptococcus albidus</i> (IFO 1044)	0 20	24	0.0 20.9	17.9 7923.9	28.7 498.8	0.0 9.9	0.0 401.0	0.0 27.5
<i>Candida versatilis</i> (IFO 1941)	0 20	24	0.0 8.0	38.7 2912.6	118.5 391.8	8.0 0.0	0.0 452.4	0.0 33.5
<i>Candida diddensiae</i> (IFO 1970)	0 20	24	0.0 0.0	32.4 4892.6	81.0 191.5	0.0 0.0	0.0 491.0	3.2 24.5
<i>Candida nitratophila</i> (IFO 10004)	0 20	24	0.0 19.6	7.8 838.0	388.6 1499.2	0.0 0.0	0.0 9.7	0.0 41.3
<i>Candida krusei</i> (IFO 10255)	0 20	24	0.0 0.0	4.4 25711.2	52.6 1578.2	0.0 0.0	0.0 2477.6	0.0 101.6
<i>Candida norvegica</i> (IFO 10302)	0 20	24	0.0 606.8	14.3 17323.6	80.4 1746.0	0.0 27.6	0.0 1160.7	0.0 90.7
<i>Candida versatilis</i> (IFO 10664)	0 20	24	0.0 88.9	259.5 22173.3	445.2 1000.5	0.0 0.0	8.4 871.4	12.1 36.7
<i>Candida glabrata</i> (IFO 0006)	0 20	28	32.6 3002.5	903.1 41658.9	943.1 1984.4	0.0 68.2	18.3 1189.8	45.6 49.6

NE: ネロリドール FOH: ファルネソール GGOH: グラニオグラニオール

【0109】

* * 【表6】

培地	菌株	培養日数 (日)	SQAD (mg/L)	全抽出 ($\mu\text{g/L}$)			細胞数 $\times 10^6$ cell/L
				NE	FOH	GGOH	
YPD	<i>Fichia pastozia</i> GS115 (ATCC 20884)	4	0	0.0	62.8	64.7	1062
			20	0.0	201.1	60.6	909
		10	0	0.0	0.0	134.1	
			20	0.0	39.4	180.0	
YM	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (IFO 0638)	4	0	0.0	66.4	16.7	221
			20	0.0	239.7	39.6	109
		10	0	0.0	52.8	22.1	142
			20	0.0	243.7	26.5	124
YM	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> A451 (ATCC 20689)	4	0	0.0	96.9	29.5	51
			20	0.0	270.5	33.7	83
		10	0	0.0	98.2	41.5	34
			20	23.5	363.2	37.7	39
YM	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPH499 (ATCC 76625)	4	0	0.0	34.2	0.0	28
			20	0.0	33.5	0.0	23
		10	0	0.0	48.9	27.8	56
			20	0.0	198.9	52.4	85
YM	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 64051)	4	0	609.4	17637.7	241.4	314
			20	493.1	17180.0	218.2	277
		10	0	714.0	19650.8	246.9	235
			20	621.8	19587.2	261.6	214

NE: ネロリドール FOH: ファルネソール GGOH: グラニオグラニオール

【0110】

【表7a】

ネロリドール(NOH)、ファルネソール(FOH)及びゲラニルゲラニオール(GGOH)生産(mg/L)

菌株	No.	培養3日目			培養10日目			培養温度 (°C)	増地
		NOH	FOH	GGOH	NOH	FOH	GGOH		
<i>Alcaligenes faecalis</i>	IFO13111	0.00	0.01	0.11	0.00	0.04	0.09	30	LBO-SSI
<i>Brevibacterium divaricatum</i>	NRRL2311	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	30	LBO-SSI
<i>Brevibacterium fuscum</i>	IFO12127	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	30	LBO-SSI
<i>Brevibacterium linens</i>	IFO12171	0.00	0.46	0.00	0.00	0.08	0.00	30	LBO-SSI
<i>Candida catenulata</i>	IFO 0720	0.04	8.10	0.34	0.04	8.81	0.47	30	YMO-SSI
<i>Candida fragiicola</i>	IFO 1574	0.03	4.91	0.78	0.04	8.95	1.31	30	YMO-SSI
<i>Candida krusei</i>	IFO 0013	0.04	6.99	0.29	0.08	13.65	0.86	30	YMO-SSI
<i>Candida lambica</i>	IFO 1148	0.02	4.53	0.48	0.04	0.59	1.24	30	YMO-SSI
<i>Candida maltosa</i>	IFO 1977	0.00	6.74	0.19	0.08	9.03	0.58	30	YMO-SSI
<i>Candida mycoderma</i>	IFO 0184	0.02	5.45	0.20	0.03	4.89	0.17	30	YMO-SSI
<i>Candida parapsilosis</i>	IFO 0708	0.00	1.78	0.17	0.01	5.13	0.25	30	YMO-SSI
<i>Candida rugosa</i>	IFO 0591	0.00	0.90	0.08	0.00	4.20	0.19	30	YMO-SSI
<i>Candida succiphila</i>	IFO 1911	0.00	2.44	0.25	0.00	0.00	0.00	30	YMO-SSI
<i>Candida tropicalis</i>	IFO 0006				0.17	9.04	0.00	30	YMO-SSI
<i>Candida zeylanoides</i>	IFO 0719	0.00	1.43	0.29	0.00	7.38	1.24	30	YMO-SSI
<i>Cryptococcus albidus</i>	IFO 0881	0.00	0.15	0.03	0.02	2.41	0.45	30	YMO-SSI
<i>Cryptococcus glutinis</i>	IFO 1125	0.04	6.84	1.48	0.35	3.70	3.29	24	YMO-SSI
<i>Dapodascus oviformis</i>	IFO 1201	0.00	4.23	0.14	0.04	8.88	0.85	30	YMO-SSI
<i>Haloflex volcanii</i>	IFO 14742	2.12	39.11	1.04	4.14	57.73	2.49	30	HVO-SSI
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	IFO 1758	0.00	0.33	0.04	0.04	2.40	0.12	30	YMO-SSI
<i>Issatchenkia orientalis</i>	IFO 1279	0.00	2.22	0.15	0.03	7.68	0.52	30	YMO-SSI
<i>Kloeckera africana</i>	IFO 0888	1.09	10.90	0.81	1.10	6.29	0.17	30	YMO-SSI
<i>Kloeckera spiculata</i>	IFO 0151	0.00	0.05	0.02	1.04	10.73	0.86	30	YMO-SSI
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	IFO 0617	0.09	14.48	0.87	0.13	18.29	1.71	30	YMO-SSI
<i>Kuraishia capsulata</i>	IFO 0674	0.00	0.91	0.17	0.00	3.25	0.42	30	YMO-SSI
<i>Mortierella ramaniiana</i>	ATCC 24788				0.00	0.76	0.13	24	YMO-SSI
<i>Nekazawaia holstii</i>	IFO 0980	0.01	1.06	0.18	0.02	5.85	0.38	30	YMO-SSI

ネロリドール(NOH)、ファルネソール(FOH)及びゲラニルゲラニオール(GGOH)生産(mg/L)

菌株	No.	培養3日目			培養10日目			培養温度 (°C)	増地
		NOH	FOH	GGOH	NOH	FOH	GGOH		
<i>Pichia capsulata</i>	IFO 0984	0.00	0.83	0.04	0.04	4.17	0.11	30	YMO-SSI
<i>Pichia henricii</i>	IFO 1477	0.00	3.20	0.12	0.00	3.24	0.00	30	YMO-SSI
<i>Pichia holstii</i>	IFO 0980	0.04	6.22	0.22	0.04	2.78	0.85	30	YMO-SSI
<i>Pichia naganishii</i>	IFO 1670	0.00	2.14	0.22	0.02	8.28	0.98	30	YMO-SSI
<i>Pichia rhodanensis</i>	IFO 1272	0.03	3.34	0.91	0.48	26.57	10.29	30	YMO-SSI
<i>Pichia saitoi</i>	IAM 4945	0.34	10.78	0.51	0.28	24.31	1.38	30	YMO-SSI
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	IFO 8766	0.88	6.89	2.47	0.72	2.47	2.52	24	YMO-SSI
<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	IFO 0951	0.01	3.14	0.18	0.03	6.11	0.50	30	YMO-SSI
<i>Rhodotorula rubra</i>	IFO 0870	0.03	1.82	1.02	0.16	2.32	1.81	30	YMO-SSI
<i>Saccharomyopsis fibuligera</i>	IFO 0105	0.00	0.06	1.88	0.00	5.71	4.78	30	YMO-SSI
<i>Saccharomyopsis lipolytica</i>	IFO 1209	0.05	9.48	0.16	0.21	18.46	0.83	30	YMO-SSI
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	IAM4942	0.00	1.24	0.03	0.00	1.78	0.08	30	YMO-SSI
<i>Staphylococcus aureus</i>	IFO3080	0.00	0.06	0.00	0.00	0.05	0.00	30	YMO-SSI
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	IFO 1826	0.04	2.33	0.15	0.08	5.50	0.38	30	YMO-SSI
<i>Trichosporon cutaneum</i>	IFO 1188	0.00	10.23	0.69	0.00	0.14	0.09	30	YMO-SSI
<i>Trukamurella pseudometabolum</i>	IFO12160	0.00	0.07	0.00	0.00	0.06	0.00	30	YMO-SSI
<i>Yarrowia lipolytica</i>	IFO 0193	0.00	1.27	0.18	0.00	2.38	0.82	30	YMO-SSI
<i>Yarrowia lipolytica</i>	IFO 0748	0.08	9.88	0.15	0.18	13.41	0.36	24	YMO-SSI
<i>Zygosaccharomyces japonicus</i>	IFO 0595	0.05	0.77	0.05	0.10	2.17	0.15	30	YMO-SSI

【0111】

【表7b】

ネロリドール(NOH)、ファルネソール(FOH)及びゲラニルゲラニオール(GGOH)生産(mg/L)

菌株	IFO No.	培養3日目			培養10日目			培養温度 (°C)	培地
		NOH	FOH	GGOH	NOH	FOH	GGOH		
<i>Ambrosiomyces ambrosiae</i>	10635	0.0	0.1	1.5	0.0	0.0	0.7	24	YPD0-SSI
<i>Ambrosiomyces monospora</i>	10751	0.0	1.0	0.3	0.0	4.8	1.4	24	YMO-SSI
<i>Ambrosiomyces philetoma</i>	1847	0.0	0.9	0.2	0.0	16.8	0.8	24	YMO-SSI
<i>Ambrosiomyces platypodia</i>	10752	0.0	1.7	0.1	0.0	48.8	1.4	24	YMO-SSI
<i>Bensingtonia intermedia</i>	10178	0.0	1.5	0.7	0.0	2.9	5.2	24	YMO-SSI
<i>Bobyozyma nematodophila</i>	10830	0.0	2.5	0.3	0.0	5.8	2.8	24	YPD0-SSI
<i>Brettanomyces anomalus</i>	0827	0.0	18.0	0.4	0.8	18.7	0.0	24	YMO-SSI
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	0787	0.0	4.7	0.5	0.0	8.2	0.0	24	YMO-SSI
<i>Brettanomyces custersianus</i>	10735	0.0	0.1	1.4	0.0	20.0	0.8	24	YMO-SSI
<i>Bullera crocea</i>	10113	0.0	7.4	0.5	0.0	18.1	0.5	17	YMO-SSI
<i>Bullera sinensis</i>	10758	0.1	0.3	1.0	0.1	1.7	2.3	24	YMO-SSI
<i>Citeromyces mshtricensis</i>	0851	0.1	2.0	0.4	0.0	0.7	0.0	24	YMO-SSI
<i>Clavispora lusitanae</i>	10059	0.0	1.0	0.3	0.1	8.2	8.1	24	YMO-SSI
<i>Cystoflabosidium infirmominatum</i>	1057	5.7	14.8	2.8	10.8	48.4	3.8	24	YMO-SSI
<i>Debaryomyces occidentalis</i>	1842	0.0	0.7	0.2	0.0	0.4	4.1	24	YMO-SSI
<i>Dekkera bruxellensis</i>	1590	0.0	3.7	0.2	0.0	15.7	0.0	24	YMO-SSI
<i>Dipodascus armillaris</i>	10804	0.0	4.2	0.1	0.0	3.3	0.2	24	YMO-SSI
<i>Dipodascus tetrasperma</i>	10810	0.0	1.7	0.8	0.0	9.8	2.5	24	YMO-SSI
<i>Eremascus sibiricus</i>	10811	0.0	0.0	4.8	0.0	0.0	3.6	24	YMO-SSI
<i>Eremascus fertilis</i>	0691	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	24	YMO-SSI
<i>Eremothecium gossypii</i>	1355	0.0	0.8	0.0	0.0	4.4	0.9	24	YMO-SSI
<i>Erythrobasisidium hasagawianum</i>	1058	0.0	0.5	1.0	0.0	0.0	8.8	24	YMO-SSI

ネロリドール(NOH)、ファルネソール(FOH)及びゲラニルゲラニオール(GGOH)生産(mg/L)

菌株	IFO No.	培養3日目			培養10日目			培養温度 (°C)	培地
		NOH	FOH	GGOH	NOH	FOH	GGOH		
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	1411	0.0	1.4	0.1	0.0	1.3	0.0	24	YMO-SSI
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	10833	0.1	15.3	2.8	0.4	11.1	0.8	24	YPD0-SSI
<i>Kloeckera vinacea</i>	1415	0.4	3.4	0.3	0.7	1.2	0.0	24	YMO-SSI
<i>Kockovaeia imperatae</i>	10522	0.0	3.2	3.5	0.0	19.5	6.2	24	YMO-SSI
<i>Kodamaea ohmeri</i>	0202	0.0	7.7	1.8	0.1	13.7	4.7	24	YMO-SSI
<i>Kurtzmanomyces neotairi</i>	10118	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	24	YMO-SSI
<i>Leucosporidium scottii</i>	1924	0.2	32.8	1.3	0.7	5.2	0.0	24	YMO-SSI
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	1876	0.1	14.8	2.0	0.1	15.7	0.0	24	YMO-SSI
<i>Malassezia furfur</i>	0856	0.0	4.3	0.1	0.0	8.9	0.1	30	YMO-SSI
<i>Metchnikowia hawaiiensis</i>	10791	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.2	24	YPD0-SSI
<i>Metchnikowia krisii</i>	1677	0.0	1.3	0.1	0.0	21.0	0.0	24	YMO-SSI
<i>Metchnikowia lunata</i>	1605	0.0	5.1	1.0	0.3	31.9	5.9	24	YMO-SSI
<i>Metchnikowia pulcherrima</i>	0863	0.0	10.5	0.2	0.1	15.4	0.3	24	YMO-SSI
<i>Mrakia frigida</i>	1926	0.5	25.3	0.3	0.3	11.3	0.1	12	YMO-SSI
<i>Myxozyma lipomycoides</i>	10351	0.7	23.3	5.4	1.3	35.0	1.1	24	YMO-SSI
<i>Nadsonia commutata</i>	10029	0.0	0.1	0.0	0.0	0.3	0.0	17	YMO-SSI
<i>Pachysolen tannophilus</i>	1007	0.0	0.1	0.1	0.0	1.9	1.4	24	YMO-SSI
<i>Pichia burtonii</i>	10837	0.0	3.0	1.1	0.0	7.5	1.7	24	YMO-SSI
<i>Pichia misumaiensis</i>	10221	0.3	20.8	1.8	1.0	14.5	2.0	24	YMO-SSI
<i>Pichia ofunensis</i>	10709	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	24	YMO-SSI
<i>Pichia pipperi</i>	1290	0.5	5.1	0.6	0.5	8.4	0.5	24	YMO-SSI
<i>Saccharomyces transvaalensis</i>	1825	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	30	YMO-SSI

ネロリドール(NOH)、アールネソール(FOH)及びガラニルガラニオール(GGOH)生産(mg/L)

菌株	IFO No.	培養3日目			培養10日目			培養温度 (°C)	培地
		NOH	FOH	GGOH	NOH	FOH	GGOH		
<i>Saccharomyces eiseniae</i>	10111	0.1	0.4	0.0	0.6	0.8	0.1	30	YMO-SSI
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	10829	0.0	0.0	4.1	0.0	0.0	2.8	24	YPO-SSI
<i>Saccharomycopsis javeensis</i>	1848	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	24	YMO-SSI
<i>Saccharomycopsis echoenii</i>	10653	0.1	5.3	0.4	0.5	28.3	2.3	24	YMO-SSI
<i>Saccharomycopsis symmiedendra</i>	1804	0.0	2.8	1.3	0.0	1.2	0.0	24	YMO-SSI
<i>Saccharomycopsis vini</i>	1748	0.0	3.8	0.4	0.0	23.2	6.4	24	YMO-SSI
<i>Suturnispora zaruensis</i>	1384	0.0	0.2	0.1	0.0	3.0	1.3	24	YMO-SSI
<i>Schizoblastosporion kabayashi</i>	1844	0.0	4.0	0.9	0.0	2.8	4.7	24	YMO-SSI
<i>Schizoblastosporion starkyi-henrici</i>	10842	0.0	0.9	0.2	0.0	1.1	0.8	24	YPO-SSI
<i>Sporophythermia cereana</i>	10013	0.0	0.6	0.2	0.2	0.1	1.2	24	YMO-SSI
<i>Stephanosorus ciferrii</i>	1854	0.0	0.8	0.1	0.0	3.3	0.0	24	YMO-SSI
<i>Stenigmatomycetes ciferrii</i>	1843	0.0	4.5	0.5	0.1	10.5	1.8	24	YMO-SSI
<i>Stenigmatomycetes ehiae</i>	1488	0.0	0.0	0.0	0.8	0.3	0.0	24	YMO-SSI
<i>Stenigmatomycetes helophilus</i>	10121	0.0	2.4	0.1	0.0	15.7	1.3	24	YMO-SSI
<i>Stenigmatosporidium polymorphum</i>	10132	0.0	3.7	0.1	0.0	3.0	0.0	17	YMO-SSI
<i>Synpodomyces parvus</i>	10750	0.0	1.3	1.0	0.0	0.8	1.0	24	YMO-SSI
<i>Synpodomyces papillipedili</i>	1884	0.0	13.0	0.7	0.0	13.2	0.0	24	YMO-SSI
<i>Trichosporon brassicae</i>	1232	0.2	10.8	0.2	0.3	30.5	1.1	17	YMO-SSI
<i>Trichosporon pulchellum</i>	0755	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.2	24	YMO-SSI
<i>Trigonopsis variabilis</i>	10204	0.0	15.3	0.7	0.0	17.5	1.4	24	YMO-SSI
<i>Trichomyces wrightii</i>	1857	0.0	1.7	0.0	0.0	5.2	0.0	24	YMO-SSI
<i>Wickerhamella domercqiae</i>	10130	0.1	30.0	0.8	0.5	33.8	2.8	24	YMO-SSI
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	10380	0.1	6.4	5.3	0.8	24.3	5.6	24	YMO-SSI
<i>Zygozyna oligophaga</i>									

【0112】

【表7c】

ネロリドール(NOH)、ファルネソール(FOH)及びゲラニルゲラニオール(GGOH)生産(mg/L)

菌株	No.	培養3日目			培養9日目			培養温度 (°C)	培地
		NOH	FOH	GGOH	NOH	FOH	GGOH		
<i>Aciculosporidium acidestrum</i>	IFO 10124	0.0	21.3	1.4	0.0	26.4	2.3	24°C	YMO-SSI
<i>Bullera pseudosalsa</i>	IFO 10179	0.0	11.0	2.0	0.0	40.7	15.0	24°C	YMO-SSI
<i>Candida albicans</i>	IFO 1060	0.2	108.8	3.5	0.8	32.8	4.7	30°C	YMO-SSI
<i>Candida glabrata</i>	IFO 0741	0.3	19.8	0.8	3.2	70.1	4.2	30°C	YMO-SSI
<i>Candida guilliermondii</i>	IFO 0566	0.0	3.9	0.8	0.0	4.2	1.1	30°C	YMO-SSI
<i>Candida intermedia</i>	IFO 0781	0.0	56.2	2.5	0.1	87.0	6.2	30°C	YMO-SSI
<i>Candida kefyr</i>	IFO 0708	0.3	28.2	2.0	0.7	15.8	2.9	30°C	YMO-SSI
<i>Candida krusei</i>	IFO 0941	0.5	37.8	4.0	3.7	7.8	8.0	30°C	YMO-SSI
<i>Candida tenuis</i>	IFO 0716	0.0	2.2	0.2	0.0	31.2	2.2	30°C	YMO-SSI
<i>Candida utilis</i>	IFO 0819	0.2	42.2	5.5	0.8	52.5	11.1	30°C	YMO-SSI
<i>Cryptococcus humicola</i>	IFO 0753	0.2	6.3	2.0	0.0	0.3	3.3	30°C	YMO-SSI
<i>Cryptococcus terreus</i>	IFO 0727	0.0	1.2	0.1	0.2	1.9	0.3	30°C	YMO-SSI
<i>Debaryomyces castellii</i>	IFO 1359	0.0	11.4	1.1	0.0	28.8	4.6	30°C	YMO-SSI
<i>Fellomyces penicillatus</i>	IFO 10119	0.0	2.9	0.3	0.1	45.7	4.4	24°C	YMO-SSI
<i>Filobasidium capsuligenum</i>	IFO 1185	0.0	51.0	1.1	0.2	106.8	3.6	24°C	YMO-SSI
<i>Filobasidium uniguttulatum</i>	IFO 0699	0.0	28.7	1.3	0.4	85.4	8.9	24°C	YMO-SSI
<i>Kloeckera cortis</i>	IFO 0633	0.4	42.8	2.3	1.2	62.1	8.2	30°C	YMO-SSI
<i>Hortmannia corniformis</i>	IFO 10742	0.0	25.4	2.8	1.1	50.7	8.4	24°C	YMO-SSI
<i>Kuyveromyces marxianus</i>	IFO 0817	0.0	18.6	0.8	0.4	35.1	5.0	30°C	YMO-SSI
<i>Phaffia rhodozyma</i>	ATCC 66270	0.0	2.2	0.1	0.5	108.7	5.8	24°C	YMO-SSI
<i>Pichia anomala</i>	IFO 0148	0.2	34.8	2.6	0.2	7.4	4.3	30°C	YMO-SSI
<i>Pichia fabianii</i>	IFO 1254	0.0	14.3	1.5	0.2	0.1	4.2	30°C	YMO-SSI
<i>Pichia farinosa</i>	IFO 1003	0.0	3.2	0.8	0.0	11.1	1.8	30°C	YMO-SSI
<i>Pichia jadinii</i>	IFO 0887	0.0	23.1	2.0	0.1	24.6	8.3	30°C	YMO-SSI
<i>Pichia polymorpha</i>	IFO 0195	0.3	21.8	3.2	0.4	0.6	5.2	30°C	YMO-SSI
<i>Pichia stivicola</i>	IFO 0807	0.2	10.6	1.6	0.8	29.0	4.2	30°C	YMO-SSI

ネロリドール(NOH)、ファルネソール(FOH)及びゲラニルゲラニオール(GGOH)生産(mg/L)

菌株	No.	培養3日目			培養9日目			培養温度 (°C)	培地
		NOH	FOH	GGOH	NOH	FOH	GGOH		
<i>Rhodotorula glutinis</i>	IFO 0895	0.0	3.8	0.2	0.0	3.4	0.3	30°C	YMO-SSI
<i>Rhodotorula minuta</i>	IFO 0715	0.3	8.8	12.0	3.4	5.0	0.7	30°C	YMO-SSI
<i>Rhodotorula rubra</i>	IFO 0870	0.3	5.5	10.8	3.5	4.4	28.4	30°C	YMO-SSI
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IFO 0258	0.0	22.3	0.6	0.4	77.5	1.9	30°C	YMO-SSI
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IFO 2347	0.0	18.8	0.7	0.1	36.5	1.4	30°C	YMO-SSI
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	IFO 10038	0.0	3.3	0.2	0.1	15.5	0.4	24°C	YMO-SSI
<i>Saccharomyopsis fermentans</i>	IFO 10772	0.1	41.4	1.9	0.3	37.9	3.1	24°C	YMO-SSI
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	IFO 1035	0.1	7.9	1.1	0.1	42.3	6.4	30°C	YMO-SSI
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	IFO 0374	0.1	28.8	3.4	0.6	35.7	14.4	30°C	YMO-SSI
<i>Trichosporella flavificans</i>	IFO 1573	0.0	0.0	0.0	0.2	31.5	3.0	24°C	YMO-SSI
<i>Trichosporon penicillatum</i>	JCM 2171	0.0	1.7	0.6	0.1	1.7	0.0	30°C	YMO-SSI
<i>Willkopsia californica</i>	IFO 0800	10.1	95.7	4.7	10.5	90.1	5.2	24°C	YMO-SSI
<i>Willkopsia asturinus</i>	IFO 0885	0.5	58.1	9.0	1.8	68.2	13.1	30°C	YMO-SSI
<i>Yarrowia lipolytica</i>	IFO 0459	0.0	6.2	0.8	0.0	20.8	2.2	30°C	YMO-SSI
<i>Zygosaccharomyces rouzetii</i>	IFO 10184	0.0	3.9	0.1	0.0	32.4	2.7	24°C	YMO-SSI

【0113】表1に示す微生物菌株の培養は、同表に示す各培地にスクアレニン合成酵素阻害剤(SQAD, BMS)を添加した培地に於て30°C、4日間培養した。培養上清画分(表1a)、菌体画分(表1b)のブレニルアルコール(ネロリドール、ファルネソール、ゲラニルゲラニオール)の抽出の際にはフォスファターゼ処理を行った。SQAD, BMSのいずれを添加することによっても酵母のブレニルアルコールの生産性が上昇した。Saccharomycopsis fibuligera IF01665株のように、通常の培養ではブレニルアルコールの生産が全く認められない株であっても、生産が検出されるようになる株もあった。

【0114】表2に示す微生物菌株の培養は、スクアレニン合成酵素阻害剤(SQAD)を添加したKB+1%大豆油培地に於て30°C、4日間培養した。培養上清画分、菌体画分のブレニルアルコール(ネロリドール、ファルネソール、ゲラニルゲラニオール)の抽出の際にはフォスファターゼ処理を行った。表1の結果と同様に、細菌においてもSQADの添加によってファルネソール生産の

増加が認められた。

【0115】表3に示す微生物菌株の培養は、スクアレニン合成酵素阻害剤(SQAD)をそれぞれ添加したYM培地(表3a)又はYM+1%大豆油培地(表3b)に於て30°C、4日間培養した。培養上清画分、菌体画分のブレニルアルコール(ネロリドール、ファルネソール、ゲラニルゲラニオール)の抽出の際にはフォスファターゼ処理を行った。いずれの培地系でもSQADの添加によって通常の培養ではブレニルアルコールの生産が全く認められない株であっても、生産が検出されるようになる株が存在した。また、大豆油を添加した系ではさらに効果が顕著になる。

【0116】表4に示す微生物菌株の培養は、スクアレニン合成酵素阻害剤(SQAD)をそれぞれ添加したYM, KB, KY培地(表4a)、又はYM, KB, KY+1%大豆油培地(表4b)に於て30°Cで一週間培養した。培養上清画分、菌体画分のブレニルアルコール(ネロリドール、ファルネソール、ゲラニルゲラニオール)の抽出の際にはフォスファターゼ処理を行った。いずれ

も大豆油を添加した系では生産性が高く、またSQADの添加によってプレニルアルコールの生産性が上昇し、50mg/L以上のファルネソールを生産する株も見られた。

【0117】表5に示す微生物菌株の培養は、スクアレノ合成酵素阻害剤(SQAD)をそれぞれ添加したYMO培地に同表に示す温度で7日間培養した。全画分(培養上清画分、菌体画分)のプレニルアルコール(ネロリドール、ファルネソール、ゲラニルゲラニオール)の抽出の際にはフォスファターゼ処理を行った。いずれもSQADの添加によってプレニルアルコールの生産性が上昇した。

【0118】表6に示す微生物菌株の培養は、スクアレノ合成酵素阻害剤(SQAD)をそれぞれ添加したYPD又はYM培地に、5%グルコース、3%大豆油、0.1%アデカノール LG109を添加し、当該培地に30°Cで4〜10日間培養した。全画分(培養上清画分、菌体画分)のプレニルアルコール(ネロリドール、ファルネソール、ゲラニルゲラニオール)の抽出の際にはフォスファターゼ処理を行った。いずれもSQADの添加によってプレニルアルコールの生産性が上昇した。

*20

SEQUENCE LISTING

```

<110> TOYOTA JIDOSHA KABUSHIKI KAISHA
<120> A method of producing prenylalcohol
<130> P01-0873
<150> JP 2001-21547
<151> 2001-01-30
<160> 14
<170> PatentIn Ver. 2.0
<210> 1
<211> 3165
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(3162)
<400> 1
atg ccg ccg cta ttc aag gga ctg aaa caa atg gca aag cca att gcc 48
Met Pro Pro Leu Phe Lys Gly Leu Lys Gln Met Ala Lys Pro Ile Ala
1 5 10 15
tat gtt tca aga ttt tcg ccg aaa cga cca att cat ata ata ctt ttt 96
Tyr Val Ser Arg Phe Ser Ala Lys Arg Pro Ile His Ile Ile Leu Phe
20 25 30
tct cta atc ata tcc gca ttc gct tat cta tcc gtc att caa tat tac 144
Ser Leu Ile Ile Ser Ala Phe Ala Tyr Leu Ser Val Ile Gln Tyr Tyr
35 40 45
ttc aat qgt tgg caa cta gat tca aat agt gtt ttt gaa act gct cca 192
Phe Asn Gly Trp Gln Leu Asp Ser Asn Ser Val Phe Glu Thr Ala Pro
50 55 60
aat aaa gac tcc aac act cta ttt caa gaa tgt tcc cat tac tac aga 240
Asn Lys Asp Ser Asn Thr Leu Phe Gln Glu Cys Ser His Tyr Tyr Arg

```

*【0119】表7に示す微生物菌株の培養は、スクアレノ合成酵素阻害剤(SQAD)をそれぞれ添加したYPD-SSI、YMO-SSI、LBO-SSI又はHVO-SSI培地中、表に示す温度にて、3〜10日間(表7a及び表7b)又は3〜9日間(表7c)試験管培養した。フォスファターゼ処理を行わず全抽出し、プレニルアルコール(ネロリドール、ファルネソール、ゲラニルゲラニオール)の生産量を調べた。いずれもSQADの添加によってプレニルアルコールの生産性が上昇し、種々の微生物にこの方法が適用できることがわかる。

【0120】

【発明の効果】本発明によれば、医薬品・香料・化粧品・食品に利用可能なテルペン類、カロチノイド類、ステロイド類の生合成中間体として有用な、ゲラニルゲラニオール、ファルネソールなどのプレニルアルコールの生産効率を向上させることができる。

【0121】

【配列表】

55			56
65	70	75	80
gat tcc tct cta gat ggt tgg gta tca atc acc gcg cat gaa gct agt			288
Asp Ser Ser Leu Asp Gly Trp Val Ser Ile Thr Ala His Glu Ala Ser			
	85	90	95
gaq tta cca gcc cca cac cat tac tat cta tta aac ctg aac ttc aat			336
Glu Leu Pro Ala Pro His His Tyr Tyr Leu Leu Asn Leu Asn Phe Asn			
	100	105	110
agt cct aat gaa act gac tcc att cca gaa cta gct aac acg qtt ttt			384
Ser Pro Asn Glu Thr Asp Ser Ile Pro Glu Leu Ala Asn Thr Val Phe			
	115	120	125
gaq aaa gat aat aca aaa tat att ctg caa gaa gat ctc agt gtt tcc			432
Glu Lys Asp Asn Thr Lys Tyr Ile Leu Gln Glu Asp Leu Ser Val Ser			
	130	135	140
aaa gaa att tct tct act gat gga acg aaa tgg agg tta aqa agt gac			480
Lys Glu Ile Ser Ser Thr Asp Gly Thr Lys Trp Arg Leu Arg Ser Asp			
	145	150	155
aga aaa agt ctt ttc gac gta aag acg tta gca tat tct ctc tac gat			528
Arg Lys Ser Leu Phe Asp Val Lys Thr Leu Ala Tyr Ser Leu Tyr Asp			
	165	170	175
gta ttt tca gaa aat gta acc caa gca gac ccg ttt gac gtc ctt att			576
Val Phe Ser Glu Asn Val Thr Gln Ala Asp Pro Phe Asp Val Leu Ile			
	180	185	190
atg gtt act gcc tac cta atg atg ttc tac acc ata ttc ggc ctc ttc			624
Met Val Thr Ala Tyr Leu Met Met Phe Tyr Thr Ile Phe Gly Leu Phe			
	195	200	205
aat gac atg agg aag acc ggg tca aat ttt tgg ttg agc gcc tct aca			672
Asn Asp Met Arg Lys Thr Gly Ser Asn Phe Trp Leu Ser Ala Ser Thr			
	210	215	220
gtg gtc aat tct gca tca tca ctt ttc tta gca ttg tat gtc acc caa			720
Val Val Asn Ser Ala Ser Ser Leu Phe Leu Ala Leu Tyr Val Thr Gln			
	225	230	235
			240
tgt att cta ggc aaa gaa gtt tcc gca tta act ctt ttt gaa ggt ttg			768
Cys Ile Leu Gly Lys Glu Val Ser Ala Leu Thr Leu Phe Glu Gly Leu			
	245	250	255
cct ttc att gta gtt gtt gtt ggt ttc aag cac aaa atc aag att gcc			816
Pro Phe Ile Val Val Val Val Gly Phe Lys His Lys Ile Lys Ile Ala			
	260	265	270
caq tat gcc ctg gag aaa ttt gaa aga gtc ggt tta tct aaa agg att			864
Gln Tyr Ala Leu Glu Lys Phe Glu Arg Val Gly Leu Ser Lys Arg Ile			
	275	280	285
act acc gat gaa atc gtt ttt gaa tcc gtg agc gaa gag ggt ggt cgt			912
Thr Thr Asp Glu Ile Val Phe Glu Ser Val Ser Glu Glu Gly Gly Arg			
	290	295	300
ttg att caa gac cat ttg ctt tgt att ttt gcc ttt atc qga tgc tct			960
Leu Ile Gln Asp His Leu Leu Cys Ile Phe Ala Phe Ile Gly Cys Ser			
	305	310	315
atg tat gct cac caa ttg aag act ttg aca aac ttc tgc ata tta tca			1008
Met Tyr Ala His Gln Leu Lys Thr Leu Thr Asn Phe Cys Ile Leu Ser			

57

58

	325	330	335	
gca ttt atc cta att ttt gaa ttg att tta act cct aca ttt tat tct				1056
Ala Phe Ile Leu Ile Phe Glu Leu Ile Leu Thr Pro Thr Phe Tyr Ser				
	340	345	350	
gct atc tta gcg ctt aqa ctg gaa atg aat gtt atc cac aga tct act				1104
Ala Ile Leu Ala Leu Arg Leu Glu Met Asn Val Ile His Arg Ser Thr				
	355	360	365	
att atc aag caa aca tta gaa gaa gac qgt gtt gtt cca tct aca gca				1152
Ile Ile Lys Gln Thr Leu Glu Glu Asp Gly Val Val Pro Ser Thr Ala				
	370	375	380	
aqa atc att tct aaa gca gaa aag aaa tcc gta tct tct ttc tta aat				1200
Arg Ile Ile Ser Lys Ala Glu Lys Lys Ser Val Ser Ser Phe Leu Asn				
	385	390	395	400
ctc agt gtg gtt gtc att atc atg aaa ctc tct gtc ata ctg ttg ttt				1248
Leu Ser Val Val Val Ile Ile Met Lys Leu Ser Val Ile Leu Leu Phe				
	405	410	415	
gtc ttc atc aac ttt tat aac ttt ggt gca aat tgg gtc aat gat gcc				1296
Val Phe Ile Asn Phe Tyr Asn Phe Gly Ala Asn Trp Val Asn Asp Ala				
	420	425	430	
ttc aat tca ttg tac ttc gat aag gaa cgt gtt tct cta cca gat ttt				1344
Phe Asn Ser Leu Tyr Phe Asp Lys Glu Arg Val Ser Leu Pro Asp Phe				
	435	440	445	
att acc tcg aat gcc tct gaa aac ttt aaa gaq caa qct att gtt agt				1392
Ile Thr Ser Asn Ala Ser Glu Asn Phe Lys Glu Gln Ala Ile Val Ser				
	450	455	460	
gtc acc cca tta tta tat tac aaa ccc att aag tcc tac caa cgc att				1440
Val Thr Pro Leu Leu Tyr Tyr Lys Pro Ile Lys Ser Tyr Gln Arg Ile				
	465	470	475	480
gaq gat atg gtt ctt cta ttg ctt cgt aat gtc agt gtt gcc att cgt				1488
Glu Asp Met Val Leu Leu Leu Leu Arg Asn Val Ser Val Ala Ile Arg				
	485	490	495	
gat aag ttc gtc agt aaa tta gtt ctt tcc gcc tta gta tgc agt gct				1536
Asp Arg Phe Val Ser Lys Leu Val Leu Ser Ala Leu Val Cys Ser Ala				
	500	505	510	
gtc atc aat gtg tat tta ttg aat gct gct aga att cat acc agt tat				1584
Val Ile Asn Val Tyr Leu Leu Asn Ala Ala Arg Ile His Thr Ser Tyr				
	515	520	525	
act gca gac caa ttg gtg aaa act gaa gtc acc aag aag tct ttt act				1632
Thr Ala Asp Gln Leu Val Lys Thr Glu Val Thr Lys Lys Ser Phe Thr				
	530	535	540	
gct cct qta caa aag gct tct aca cca gtt tta acc aat aaa aca gtc				1680
Ala Pro Val Gln Lys Ala Ser Thr Pro Val Leu Thr Asn Lys Thr Val				
	545	550	555	560
att tct gga tcg aaa gtc aaa agt tta tca tct gcg caa tcg agc tca				1728
Ile Ser Gly Ser Lys Val Lys Ser Leu Ser Ser Ala Gln Ser Ser Ser				
	565	570	575	
tca gga cct tca tca tct agt gag gaa gat gat tcc cgc gat att gaa				1776
Ser Gly Pro Ser Ser Ser Ser Glu Glu Asp Asp Ser Arg Asp Ile Glu				
	580	585	590	

agc ttg gat aag aaa ata cgt cct tta gaa gaa tta gaa gca tta tta 1824
 Ser Leu Asp Lys Lys Ile Arg Pro Leu Glu Glu Leu Glu Ala Leu Leu
 595 600 605
 agt agt gga aat aca aaa caa ttg aag aac aaa gag gtc gct gcc ttg 1872
 Ser Ser Gly Asn Thr Lys Gln Leu Lys Asn Lys Glu Val Ala Ala Leu
 610 615 620
 gtt att cac ggt aag tta cct ttg tac gct ttg gag aaa aaa tta ggt 1920
 Val Ile His Gly Lys Leu Pro Leu Tyr Ala Leu Glu Lys Lys Leu Gly
 625 630 635 640
 gat act acg aga gcg gtt ccg gta cgt aag aag gct ctt tca att ttg 1968
 Asp Thr Thr Arg Ala Val Ala Val Arg Arg Lys Ala Leu Ser Ile Leu
 645 650 655
 gca gaa gct cct gta tta gca tct gat cgt tta cca tat aaa aat tat 2016
 Ala Glu Ala Pro Val Leu Ala Ser Asp Arg Leu Pro Tyr Lys Asn Tyr
 660 665 670
 gac tac gac cgc gta ttt ggc gct tgt tgt gaa aat gtt ata ggt tac 2064
 Asp Tyr Asp Arg Val Phe Gly Ala Cys Cys Glu Asn Val Ile Gly Tyr
 675 680 685
 atg cct ttg ccc gtt ggt gtt ata ggc ccc ttg gtt atc gat ggt aca 2112
 Met Pro Leu Pro Val Gly Val Ile Gly Pro Leu Val Ile Asp Gly Thr
 690 695 700

 tct tat cat ata cca atg gca act aca gag ggt tgt ttg gta gct tct 2160
 Ser Tyr His Ile Pro Met Ala Thr Thr Glu Gly Cys Leu Val Ala Ser
 705 710 715 720
 gcc atg cgt ggc tgt aag gca atc aat gct ggc ggt ggt gca aca act 2208
 Ala Met Arg Gly Cys Lys Ala Ile Asn Ala Gly Gly Gly Ala Thr Thr
 725 730 735
 gtt tta act aag gat ggt atg aca aga ggc cca gta gtc cgt ttc cca 2256
 Val Leu Thr Lys Asp Gly Met Thr Arg Gly Pro Val Val Arg Phe Pro
 740 745 750
 act ttg aaa aga tct ggt gcc tgt aag ata tqg tta gac tca gaa gag 2304
 Thr Leu Lys Arg Ser Gly Ala Cys Lys Ile Trp Leu Asp Ser Glu Glu
 755 760 765
 gga caa aac gca att aaa aaa gct ttt aac tct aca tca aga ttt gca 2352
 Gly Gln Asn Ala Ile Lys Lys Ala Phe Asn Ser Thr Ser Arg Phe Ala
 770 775 780
 cgt ctg caa cat att caa act tgt cta gca gga gat tta ctc ttc atg 2400
 Arg Leu Gln His Ile Gln Thr Cys Leu Ala Gly Asp Leu Leu Phe Met
 785 790 795 800
 aqa ttt aga aca act act ggt gac gca atg ggt atg aat atg att tct 2448
 Arg Phe Arg Thr Thr Thr Gly Asp Ala Met Gly Met Asn Met Ile Ser
 805 810 815
 aaa ggt gtc gaa tac tca tta aag caa atg gta gaa gag tat ggc tqg 2496
 Lys Gly Val Glu Tyr Ser Leu Lys Gln Met Val Glu Glu Tyr Gly Trp
 820 825 830
 gaa gat atg gag gtt gtc tcc gtt tct ggt aac tac tgt acc gac aaa 2544
 Glu Asp Met Glu Val Val Ser Val Ser Gly Asn Tyr Cys Thr Asp Lys
 835 840 845

61

62

```

aaa cca gct gcc atc aac tgg atc gaa ggt cgt ggt aag agt qtc qtc 2592
Lys Pro Ala Ala Ile Asn Trp Ile Glu Gly Arg Gly Lys Ser Val Val
      850              855              860

gca gaa gct act att cct ggt gat gtt qtc aga aaa gtg tta aaa agt 2640
Ala Glu Ala Thr Ile Pro Gly Asp Val Val Arg Lys Val Leu Lys Ser
865              870              875              880

gat gtt tcc gca ttg gtt gaa ttg aac att gct aag aat ttg gtt qga 2688
Asp Val Ser Ala Leu Val Glu Leu Asn Ile Ala Lys Asn Leu Val Gly
      885              890              895

tct gca atg gct ggg tct gtt ggt gga ttt aac gca cat gca gct aat 2736
Ser Ala Met Ala Gly Ser Val Gly Gly Phe Asn Ala His Ala Ala Asn
      900              905              910

tta gtg aca gct gtt ttc ttg gca tta gga caa gat cct gca caa aat 2784
Leu Val Thr Ala Val Phe Leu Ala Leu Gly Gln Asp Pro Ala Gln Asn
      915              920              925

gtt gaa agt tcc aac tgt ata aca ttg atg aaa gaa gtg gac ggt gat 2832
Val Glu Ser Ser Asn Cys Ile Thr Leu Met Lys Glu Val Asp Gly Asp
      930              935              940

ttg aga att tcc gta tcc atg cca tcc atc gaa gta ggt acc atc ggt 2880
Leu Arg Ile Ser Val Ser Met Pro Ser Ile Glu Val Gly Thr Ile Gly
945              950              955              960

ggt ggt act gtt cta gaa cca caa ggt gcc atg ttg gac tta tta ggt 2928
Gly Gly Thr Val Leu Glu Pro Gln Gly Ala Met Leu Asp Leu Leu Gly
      965              970              975

gta aga ggc ccg cat gct acc gct cct ggt acc aac gca cgt caa tta 2976
Val Arg Gly Pro His Ala Thr Ala Pro Gly Thr Asn Ala Arg Gln Leu
      980              985              990

gca aga ata gtt gcc tgt gcc qtc ttg gca ggt gaa tta tcc tta tgt 3024
Ala Arg Ile Val Ala Cys Ala Val Leu Ala Gly Glu Leu Ser Leu Cys
      995              1000              1005

gct gcc cta gca gcc ggc cat ttg gtt caa agt cat atg acc cac aac 3072
Ala Ala Leu Ala Ala Gly His Leu Val Gln Ser His Met Thr His Asn
      1010              1015              1020

agg aaa cct gct gaa cca aca aaa cct aac aat ttg gac gcc act gat 3120
Arg Lys Pro Ala Glu Pro Thr Lys Pro Asn Asn Leu Asp Ala Thr Asp
      1025              1030              1035              1040

ata aat cgt ttg aaa gat ggg tcc gtc acc tgc att aaa tcc taa 3165
Ile Asn Arg Leu Lys Asp Gly Ser Val Thr Cys Ile Lys Ser
      1045              1050

```

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 2

atgccgccgc tattcaaggc act

23

<210> 3

<211> 23

63

64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 3

ttaaqtattta atgcaqqtqa cgg

23

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 4

tttcagtcctc ttgaatacgc gcgggat

27

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 5

tctgacggtt taccatataa aaattat

27

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 6

tgcatctcga gggccgcac atgtaattag

30

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 7

cattaggtac cggccgcaaa ttaaagcctt cg

32

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 8

tgcatctcga gggccgcac atgtaattag

30

<210> 9

<211> 32

<212> DNA

65

66

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 9

cattagggcc cggccqcaaa ttaagcctt cq

32

<210> 10

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 10

cacggagctc cagttcgagt ttatcattat caa

33

<210> 11

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 11

ctctccgqg tttqtttqtt tatgtgtgtt tattc

35

<210> 12

<211> 1008

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1005)

<400> 12

atg qag gcc aag ata gat qag ctg atc aat aat gat cct gtt tqg tcc 48
 Met Glu Ala Lys Ile Asp Glu Leu Ile Asn Asn Asp Pro Val Trp Ser

1 5 10 15

agc caa aat gaa agc ttg att tca aaa cct tat aat cac atc ctt ttg 96
 Ser Gln Asn Glu Ser Leu Ile Ser Lys Pro Tyr Asn His Ile Leu Leu

20 25 30

aaa cct ggc aag aac ttt aga cta aat tta ata gtt caa att aac aga 144
 Lys Pro Gly Lys Asn Phe Arg Leu Asn Leu Ile Val Gln Ile Asn Arg

35 40 45

gtt atg aat ttg ccc aaa gac cag ctg gcc ata gtt tcg caa att gtt 192
 Val Met Asn Leu Pro Lys Asp Gln Leu Ala Ile Val Ser Gln Ile Val

50 55 60

qag ctg ttg cat aat tcc agc ctt tta atc qac qat ata qaa qat aat 240
 Glu Leu Leu His Asn Ser Ser Leu Leu Ile Asp Asp Ile Glu Asp Asn

65 70 75 80

gct ccc ttg aga agg gga cag acc act tct cac tta atc ttc ggt gta 288
 Ala Pro Leu Arg Arg Gly Gln Thr Thr Ser His Leu Ile Phe Gly Val

85 90 95

ccc tcc act ata aac acc gca aat tat atg tat ttc aga gcc atg caa 336
 Pro Ser Thr Ile Asn Thr Ala Asn Tyr Met Tyr Phe Arg Ala Met Gln

67

68

100	105	110	
ctt qta tcg cag cta acc aca aaa gag cct ttg tat cat aat ttg att	384		
Leu Val Ser Gln Leu Thr Thr Lys Glu Pro Leu Tyr His Asn Leu Ile			
115	120	125	
acg att ttc aac gaa gaa ttg atc aat cta cat agg gga caa ggc ttg	432		
Thr Ile Phe Asn Glu Glu Leu Ile Asn Leu His Arg Gly Gln Gly Leu			
130	135	140	
gat ata tac tgg aqa gac ttt ctg cct gaa atc ata cct act cag gag	480		
Asp Ile Tyr Trp Arg Asp Phe Leu Pro Glu Ile Ile Pro Thr Gln Glu			
145	150	155	160
atg tat ttg aat atg gtt atg aat aaa aca ggc ggc ctt ttc aqa tta	528		
Met Tyr Leu Asn Met Val Met Asn Lys Thr Gly Gly Leu Phe Arg Leu			
165	170	175	
acg ttg aqa ctc atg gaa ggc ctg tct cct tcc tca cac cac ggc cat	576		
Thr Leu Arg Leu Met Glu Ala Leu Ser Pro Ser Ser His His Gly His			
180	185	190	
tcg ttg gtt cct ttc ata aat ctt ctg ggt att att tat cag att aga	624		
Ser Leu Val Pro Phe Ile Asn Leu Leu Gly Ile Ile Tyr Gln Ile Arg			
195	200	205	
gat gat tac ttg aat ttg aaa gat ttc caa atg tcc agc gaa aaa ggc	672		
Asp Asp Tyr Leu Asn Leu Lys Asp Phe Gln Met Ser Ser Glu Lys Gly			
210	215	220	
ttt gct gag gac att aca gag ggg aag tta tct ttt ccc atc gtc cac	720		
Phe Ala Glu Asp Ile Thr Glu Gly Lys Leu Ser Phe Pro Ile Val His			
225	230	235	240
gcc ctt aac ttc act aaa acg aaa ggt caa act gag caa cac aat gaa	768		
Ala Leu Asn Phe Thr Lys Thr Lys Gly Gln Thr Glu Gln His Asn Glu			
245	250	255	
att cta aga att ctc ctg ttg agg aca agt gat aaa gat ata aaa cta	816		
Ile Leu Arg Ile Leu Leu Leu Arg Thr Ser Asp Lys Asp Ile Lys Leu			
260	265	270	
aag ctg att caa ata ctg gaa ttc gac acc aat tca ttg gcc tac acc	864		
Lys Leu Ile Gln Ile Leu Glu Phe Asp Thr Asn Ser Leu Ala Tyr Thr			
275	280	285	
aaa aat ttt att aat caa tta gtg aat atg ata aaa aat gat aat gaa	912		
Lys Asn Phe Ile Asn Gln Leu Val Asn Met Ile Lys Asn Asp Asn Glu			
290	295	300	
aat aag tat tta cct gat ttg gct tcg cat tcc gac acc gcc acc aat	960		
Asn Lys Tyr Leu Pro Asp Leu Ala Ser His Ser Asp Thr Ala Thr Asn			
305	310	315	320
tta cat gac gaa ttg tta tat ata ata gac cac tta tcc gaa ttg tga	1008		
Leu His Asp Glu Leu Leu Tyr Ile Ile Asp His Leu Ser Glu Leu			
325	330	335	

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 13

atggaagcca agatagatga gct

23

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 14

tcacaattc qataaqtqgt cta

23

【図面の簡単な説明】

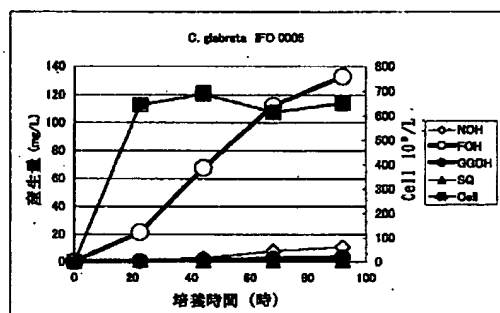
* ル GGOH: ゲラニオゲラニオールSQ: スクアレン

【図1】 Candida glabrata IFO 0005株の培養プロフィール Cell:細胞)

ールを示す。(NOH:ネオリドール FOH:ファルネソール*

【図1】

Candida glabrata IFO 0005株の培養プロフィール



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テーマコード (参考)

(C 1 2 P 7/04

C 1 2 R 1:72

C 1 2 R 1:84)

1:44

(C 1 2 P 7/04

C 1 2 R 1:265

C 1 2 R 1:72)

1:05

(C 1 2 P 7/04

C 1 2 R 1:01

C 1 2 R 1:44)

1:645

(C 1 2 P 7/04

C 1 2 R 1:265)

(C 1 2 P 7/04

C 1 2 R 1:05)

(C 1 2 P 7/04

C 1 2 R 1:01)

(C 1 2 P 7/04

C 1 2 R 1:645)

(37)

特開 2 0 0 2 - 3 0 0 8 9 6

(72)発明者 清水 昌

京都府京都市右京区常盤山下町 6 - 9

F ターム(参考) 4B064 AC09 CA02 CA06 CA19 CC01

CD04